

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

DIE BEDEUTUNG OBERFLÄCHENGEBUNDENER CHEMOTAXANSMOLEKÜLE
FÜR DIE MIGRATION VON LEUKOZYTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz dem
Medizinischen Fachbereich

vorgelegt von

Hans-Dieter Wilhelmi
aus Trier

Mainz 1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

DIE BEDEUTUNG OBERFLÄCHENGEBUNDENER CHEMOTAXANSMOLEKÜLE
FÜR DIE MIGRATION VON LEUKOZYTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz dem
Medizinischen Fachbereich

vorgelegt von

Hans-Dieter Wilhelmi

aus Trier

Mainz 1978



Dekan:	Prof.Dr.H.Leithoff
1.Gutachter:	Prof.Dr.M.P.Dierich
2.Gutachter:	Prof.Dr.U.Hadding

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. AUFGABENSTELLUNG	7
III. MATERIAL UND METHODEN	8
IV. EXPERIMENTELLER TEIL	19
A. Erstellung von Referenzwerten mit Hilfe des Standardchemotaxistests	19
B. Rolle von homogen im Filter gebundenem Kasein für die Migration von Leukozyten	21
1. Vorversuche zur Zellmigration mit kasein- vorinkubierten und gewaschenen Filtern	21
2. Variation der Zeit der Vorinkubation von Filtern in Kaseinlösungen	24
3. Untersuchung der Bindung von ^{125}Jod markiertem Kasein an Filter	24
4. Erstellung von Referenzwerten für die Migration von Zellen in chemotaxansbe- setzten Filtern	25
5. Wirkung der proteolytischen Abbauung des filtergebundenen Kaseins auf die kasein- induzierte Leukozytenmigration	31
C. Versuche zur Eigenbeweglichkeit von Leuko- zyten	34

D. Rolle von freiem Kasein für die Leukozyten- migration	37
1. Versuche zur Migration von Leukozyten bei Zugabe des Chemotaxans zur Zellsuspension	37
2. Beeinflussung der Migration von Leukozy- ten auf filtergebundenem Kasein durch zu- sätzliches, gelöstes Kasein	41
3. Versuche mit feuchten und trockenen Filtern	43
E. Rolle von gebundenen Chemotaxansgradienten für die Leukozytenmigration	44
1. Etablierung des gebundenen Chemotaxans- gradienten	44
2. Leukozytenmigration bei filtergebundenen Gradienten	45
F. Schicksal des filtergebundenen Chemotaxans	48
V. DISKUSSION	52
VI. ZUSAMMENFASSUNG	67
VII. LITERATURVERZEICHNIS	68

I. EINLEITUNG

Die Tatsache, daß bestimmte Zellen, wie z.B. begeißelte Bakterien oder auch polymorphkernige Leukozyten durch chemische Substanzen in ihrer Umgebung in ihrem Bewegungsverhalten beeinflusst werden, wurde von Pfeffer 1884 erstmals beschrieben, und "Chemotaxis" genannt (Zitat nach 38,S.3).

Die Anlockung von Zellen durch bestimmte Substanzen, oder auch die Induktion von Wegwanderung, besitzen im menschlichen Körper bei vielen Vorgängen entscheidende Bedeutung.

Bei Entzündungsvorgängen im Körper werden am Ort der Entzündung Substanzen freigesetzt, die die Ansammlung von polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen an diesem Ort bewirken (38,S.131).

Nicht gesichert ist bis heute, ob sich die Leukozyten wirklich zielgerichtet zu dem Ort der Entzündung hinbewegen. Die Ansammlung von Leukozyten an einem Ort ließe sich auch durch einen Immobilisierungsvorgang erreichen. So könnten alle Leukozyten, die sich zufällig an einem Ort vorbeibewegen, der einen solchen immobilisierenden Reiz auf sie ausübt, festgehalten werden.

Diese Überlegung tritt im Augenblick jedoch in den Hintergrund, da verschiedenste Substanzen bei Entzündungsprozessen isoliert wurden, die in vitro in der Lage sind, Leukozyten und auch Makrophagen anzulocken (38,S.54-60). Als Testsystem für die Migration von Zellen in vitro benutzt man hauptsächlich zwei Methoden:

Bei der einen Methode werden die Zellen auf einen Objektträger gebracht, auf dessen Oberfläche sie sich bewegen können (12; 41).

Die andere Methode geht auf Boyden zurück (1960). Er konstruierte eine Kammer, die zwei übereinanderliegende Anteile, sog. Kompartimente, besitzt, welche durch einen Zellulosenitratfilter mit definierter Porengröße voneinander getrennt sind (siehe Abb. 1, S. 11). Der Filter wurde nun mit Zellen überschichtet und die Einwanderung der Zellen in die Filter beobachtet (3).

Diese zweite Methode nach Boyden wird in der Regel dann angewandt, wenn es um die Quantifizierung der Wanderungsstrecken von Zellen geht, da die Einwanderungstiefe der Zellen in die Filter recht genau meßbar ist. Die theoretische Vorstellung bei dieser Methode ist, daß das durch den Filter diffundierende Chemotaxans die darauf befindlichen Zellen zum Durchwandern veranlaßt. Diese Vorstellung führte dazu, daß jede Einwanderung von Zellen in Filter auf Grund der Reizung durch eine Substanz im unteren Kompartiment einer derartigen Kammer als "Chemotaxis" bezeichnet wurde. Auch ohne Reizung zeigen die Zellen eine gewisse Beweglichkeit, die zu einer geringen Einwanderung in die Filter führt und als "random motility" bezeichnet wird.

Dieser undifferenzierte Chemotaxisbegriff wurde erst in Frage gestellt, als Wilkinson feststellte, daß die gleichzeitige Anwesenheit von Chemotaxans sowohl im oberen, als auch im unteren Kompartiment von Che-

motaxiskammern ebenfalls eine Einwanderung von Zellen in die Filter verursachen konnte (38,S. 36).

Es kristallisierten sich auf diese Weise zwei Möglichkeiten der Beeinflußung von Zellen durch bewegungsfördernde Substanzen heraus. Es erwies sich, daß sich allein durch die Anwesenheit einer derartigen Substanz eine Verstärkung der nichtgerichteten Bewegung von Leukozyten ergibt. Darüber hinaus wurde angenommen, daß das Konzentrationsgefälle, das sich durch die Diffusion einer solchen Substanz z.B. durch einen Filter ergibt, die Zellen zu gerichteter Bewegung veranlassen kann.

Es handelt sich hierbei um zwei unterscheidbare Reaktionen der Zellen, die nicht unbedingt etwas miteinander zu tun haben müssen.

Während in einer Definition der Chemotaxis von Herbert und Wilkinson (Zitat nach 38,S.4) noch beide Erscheinungen gemeinsam als Chemotaxis bezeichnet wurden, ist dies später auch begrifflich unterschieden worden. Einige der bekanntesten auf diesem Gebiet arbeitenden Autoren einigten sich auf eine Definition (20), die Mc Cutcheon 1946 anbot. Er definierte die Chemotaxis als: "A reaction by which the direction of locomotion of cells or organisms is determined by substances in their environment". Damit wird der Begriff "Chemotaxis" allein für die von bestimmten Substanzen, "Chemotaxantien", verursachte gerichtete Bewegung von Zellen gebraucht.

Für die Verstärkung der nichtgerichteten Bewegung durch chemische Substanzen wird von diesen Autoren der Begriff

"Chemokinese" vorgeschlagen.

Wilkinson (38,S.36) versucht zwischen Chemotaxis und Chemokinese zu unterscheiden, indem er ein Chemotaxans in steigenden Konzentrationen jeweils im oberen und unteren Teil der chemotaktischen Kammer gleichzeitig einsetzt, so daß kein Gradient im Filter entstehen kann.

Die Migrationsraten, die er auf diese Art und Weise erhält, werden von ihm auf eine Steigerung der ungerichteten Beweglichkeit zurückgeführt.

Als chemotaktischen Effekt kann man demnach nur die Eindringtiefe der Zellen ansehen, die bei gegebener Chemotaxanskonzentration über die vorher geprüfte Chemokinese hinausgeht.

Eine Unterscheidung zwischen der Migration von Zellen, die sich in der flüssigen Phase bewegen, wie z.B. begeißelte Bakterien und amöboid beweglichen Zellen wie z.B. die polymorphkernigen Leukozyten, wurde bisher nicht getroffen. Es wurde gewissermaßen stillschweigend unterstellt, daß auch bei den amöboid beweglichen Zellen die gleichen Reaktionsmechanismen zugrunde liegen. Die Vorstellung von Wilkinson (40) ist; daß die durch das Medium diffundierenden Chemotaxansmoleküle hauptsächlich an einer Zellseite auf die Leukozyten treffen und diese Seite dadurch zum vorangehenden Zellteil machen.

Zigmond (42) stellt sich vor, daß die Zellen die Fähigkeit besitzen, die Chemotaxanskonzentrationen an ver-

schiedenen Stellen ihrer Oberfläche zu messen und auf Grund dieses Meßvergleichs die Wanderungsrichtung zu bestimmen.

Im Unterschied zu Bakterien, deren freie Beweglichkeit im flüssigen Milieu leicht zu beobachten ist, sind für die Untersuchung amöboid beweglicher Zellen, wie Lymphozyten und Makrophagen in allen bisher berichteten Experimenten Oberflächen benutzt worden, auf denen sich die Zellen fortbewegen können. Allerdings ist bisher nicht untersucht worden, ob die stets benutzten Oberflächen eine unerläßliche Voraussetzung für amöboid bewegliche Zellen sind, oder ob eine solche Beweglichkeit auch in der flüssigen Phase stattfinden kann, wo sie jedoch extrem schwierig zu dokumentieren wäre.

Verschiedene Veröffentlichungen weisen darauf hin, daß die Oberflächenbeschaffenheit das Migrationsverhalten von Zellen beeinflußt. Keller und Sorkin stellten 1967 fest, daß die physikochemischen Eigenschaften der Filter für die Migration von darin befindlichen Zellen von Bedeutung sind (19). Carter machte im gleichen Jahr Versuche, bei denen er auf einem Objektträger einen Gradienten mit steigenden Adhäsionsmöglichkeiten für Zellen anlegte. Er konnte zeigen, daß Zellen die auf diese Oberfläche gebracht wurden, sich in Richtung der höheren Adhäsivität hin bewegten (5).

Neue Impulse kamen auch aus der Phagozytoseforschung.

Henson arbeitete bei seinen Untersuchungen über das Ver-

halten von neutrophilen Leukozyten auf nicht phagozytischen Oberflächen (14) mit Zellulosenitratfiltern, wie sie auch bei den Chemotaxisversuchen benutzt werden. Diese Filter sind in der Lage, Proteine zu binden. Henson besetzte sie mit Antigen-Antikörperkomplexen. Auf die derart behandelten Filter brachte er neutrophile Leukozyten, die in der Lage waren, sich an solche Immunkomplexe zu binden. Die Erkenntnisse von Henson über die Adhäsion von Zellen und die Phagozytose sind bisher jedoch nie im Zusammenhang mit der Migration von Zellen und im besonderen der Chemotaxis diskutiert worden. Alle Überlegungen, die die Chemotaxis betreffen gehen davon aus, daß es sich bei der chemotaktischen Reizung von Zellen um ein Phänomen handelt, das aus der flüssigen Phase heraus ausgelöst wird, vergleichbar der Chemotaxis begeißelter Bakterien. Aus diesem Grunde wurden die Ergebnisse von Carter und Henson (5; 6; 14) auch nicht in die Überlegungen zur Chemotaxis mit einbezogen.

II. AUFGABENSTELLUNG

Wie in der Einleitung dargestellt ist, stellt die Oberfläche auf der sich amöboid bewegliche Zellen befinden für deren Migrationsverhalten einen wichtigen Parameter dar.

Wir wissen, daß Zellulosenitratfilter, wie sie auch Boyden (3) in seinen Versuchen verwendet hat, Proteine binden. Entsprechend wird sich auch bei Chemotaxisversuchen Chemotaxans an diese Filter binden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe von Chemotaxiskammern nach Boyden die Bedeutung solcher Chemotaxansmoleküle für die Wanderung von Zellen zu untersuchen, die sich an den dort eingesetzten Zellulosenitratfiltern binden.

Wir möchten untersuchen, ob die am Filter gebundenen Chemotaxansmoleküle, die sich bei der Migration zwischen der migrierenden Zelle und der eigentlichen Filteroberfläche befinden, das Wanderungsverhalten der Zellen beeinflussen.

Zu diesem Zweck möchten wir im Folgenden einige Wanderungsphänomene neutrophiler Granulozyten aufzeigen und zu interpretieren suchen, die wir durch Stimulierung der Wanderung mit Hilfe von an Zellulosenitratfilter gebundenem Kasein beobachten wollten.

III. MATERIAL UND METHODEN

A. MATERIAL

a. Substanzen

Anti-human FITC-IgG vom Kaninchen	(Behring Werke Nr. TKB 04)
Beriglobin	(Behring Werke)
Chloramin T	(Merck Nr. 2426)
Eisessig	(Merck Nr. 63)
Giemsas-Lösung	(Merck Nr. 9204)
Glucose	(Merck Nr. 8337)
Glykogen	(Merck Nr. 4202)
Harris Hämatoxylin-Lösung	(Merck Nr. 9253)
^{125}Jod	(NEN Chemicals GmbH, 6072 Dreieichenhain)
Kanadabalsam	(Merck Nr. 1684)
Kasein	(Merck Nr. 2241)
May-Grünwalds Eosin-Methylenblau- lösung	(Merck Nr. 1424)
Magnesiumsulfat, MgSO_4	(Merck Nr. 5882)
Natriumchlorid, NaCl	(Merck Nr. 6404)
Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4	(Merck Nr. 6346)
Natriumhydrogenkarbonat, NaHCO_3	(Merck Nr. 6329)
di-Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4	(Merck Nr. 6579)
Natronlauge, NaOH	(Merck Nr. 9956)
Natriumdisulfit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	(Merck Nr. 6528)
Papain	(Boehringer Mannheim, Nr. 15 464)
Propanol, konz.	(Merck Nr. 9634)
Salzsäure (1 normal), HCl	(Merck Nr. 9970)
TC 199	(Flow Chemical 1 - 049 D)
Tissue-Tec	(Ames Company: Elkhart, Indiana 46514, Art Nr. 4583)
Xylol, konz.	(Apotheke der Univ.-Klin.)

b. sonstige Materialien

Kodak RPX-omat royal Film, Fa. Kodak
Selectron Filter, Porengröße $3\text{ }\mu\text{m}$
Typ AE 97/1, (Zellulosenitrat)
Fa. Schleicher und Schüll, Dassel

c. Herstellung der Lösungen

Filterfärbelösung ("blueing agent") :

20 g MgSO_4

2 g NaHCO_3

ad 1 Liter mit H_2O

Kasein Ausgangslösung:

5 g Kasein in 60 ml 1n NaOH lösen,
mit 2 m NaH_2PO_4 auf pH 7,4 einstellen,
mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen

PBS (phosphate buffered saline):

0,12m NaCl in 0,01m Natriumphosphatpuffer

Herstellung: 11,5 ml 0,2m NaH_2PO_4 x $1\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6346)

38,5 ml 0,2m Na_2HPO_4 x $12\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6579)

7,4 g NaCl (Merck 6404)

auf 1 l mit H_2O auffüllen (pH = 7,3)

TC 199 Gebrauchsmedium für den Migrationstest:

TC 199 mit PBS 1:3 verdünnen und mit 150 mg Glucose
pro 100 ml anreichern

8. Methoden

1. Testung der Zellmigration

1.1 Zellpräparation:

Einem Meerschweinchen wurden 20 ml einer 0,1 % Glykogen PBS Lösung intraperitoneal gespritzt. Sechzehn Stunden später wurde das Tier getötet und die Bauchhöhle mit 50 ml PBS gespült. Dieses Verfahren ergab im Durchschnitt 100 Millionen Zellen, die wir in 10 ml PBS aufnahmen. Mit den Differenzierungsmaßnahmen, wie sie für Blutbilder benutzt werden, ließ sich zeigen, daß zwischen 80 und 90 Prozent dieser Zellen polymorphkernige Granulozyten waren. Die Zellen wurden gewaschen, indem sie 7 min bei 1400 Upm zentrifugiert und das Sediment wieder in Medium aufgenommen wurde. Diesen Vorgang wiederholten wir zweimal. Anschließend wurde die Suspension auf 1,5 Millionen Zellen pro ml Medium eingestellt.

1.2 Chemotaxiskammern:

Wir beobachteten die Wanderung der Granulozyten mit Hilfe von Plexiglaskammern, die nach einem Vorschlag von Boyden (3) konstruiert waren.

Diese Kammern bestehen aus zwei übereinander angeordneten Räumen (dem oberen und unteren Kompartiment), die ein Fassungsvermögen von jeweils 1 ml haben und durch einen Filter voneinander getrennt sind (Abb. 1).

1.3 Filter:

Wir benutzten Filter aus Zellulosenitrat, wie es bei

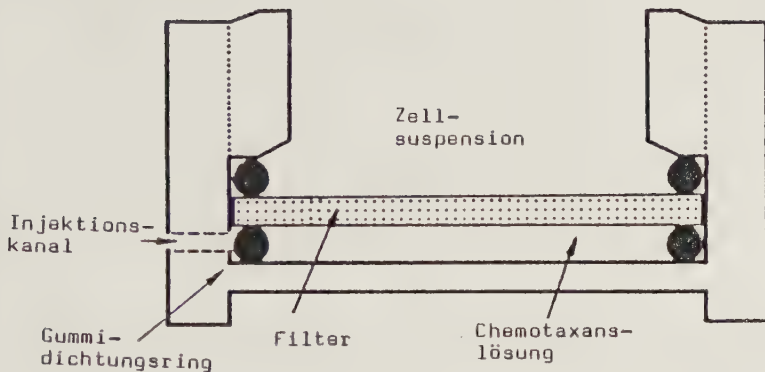


Abb. 1 - Kammer zur Durchführung von Migrationsversuchen
(nach Boyden)

Diese Kammer wurde nach dem Prinzip der Boydenkammer konstruiert. Sie besteht aus zwei Kompartimenten, die durch einen Zellulosenitratfilter voneinander getrennt sind. Durch den unteren Gummiring wird das Chemotaxans injiziert. Auf den Filter pipettiert man die Zellsuspension.

Boyden beschrieben ist (3). Da wir mit Granulozyten arbeiteten, verwendeten wir Filter mit $3\text{ }\mu\text{m}$ Porengrösse. In diese Filter vermögen nur die polymorphkernigen Leukozyten einzuwandern, da sie die einzelnen Segmente ihres Kerns hintereinander lagern können und auf diese Weise schlanker sind, als Makrophagen oder Lymphozyten. Hieraus ergab sich eine selektive Wanderung der polymorphkernigen Leukozyten in diese Filter.

1.4 Handhabung der Kammern beim Standardchemotaxisversuch:

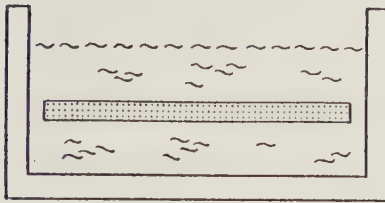
In das untere Kompartiment injizierten wir durch einen seitlich in der Kammer befindlichen Kanal 1 ml Medium, in dem das Chemotaxans gelöst war. Als Chemotaxans verwendeten wir in der Regel Kasein. Auf den Filter wurde 1 ml der Zellsuspension pipettiert. Ziel des Verfahrens war es, die auf dem Filter befindlichen Zellen zur Einwanderung zu bewegen.

1.5 Abgewandelte Handhabung von Kammern und Filtern:

Auf Grund der im experimentellen Teil beschriebenen Versuche zeigte es sich, daß die Migration von Zellen auch bei den folgenden Änderungen in der Handhabung der Filter erfolgte:

Wir inkubierten die Filter für 10 min bei Raumtemperatur in einer Chemotaxanslösung, setzten sie anschließend in eine Filternutsche ein und spülten mit 25 ml PBS (Abb. 2). Unter die derartig behandelten Filter wurden nun im Gegensatz zum Standardverfahren keine Chemotaxanslösungen,

Vorinkubation der Filter



Waschen der Filter

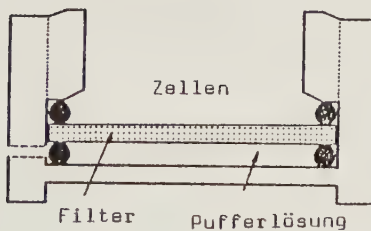
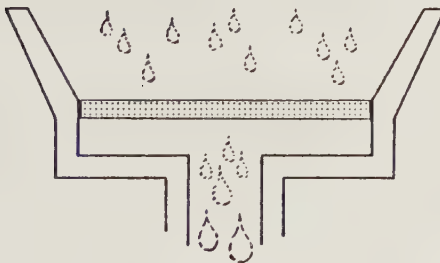


Abb. 2 - Abgewandelter Chemotaxisversuch:

Hierbei gaben wir das Chemotaxans nicht, wie bei Boyden beschrieben, in den unteren Kammeranteil, sondern badeten den Filter für 10 min direkt in der Chemotaxanslösung. Dann wuschen wir ihn in einer Filternutsche und setzten ihn in die Kammer ein. Anstelle des Chemotaxans wurde nur Medium in den unteren Kammeranteil injiziert.

sondern Medium in die Kammern eingebracht. Auf die Filter wurden wieder Zellsuspensionen gegeben.

1.6 Inkubation der Kammern:

Die gefüllten Kammern inkubierten wir für 90 min bei 37°C in einem Inkubator, der mit einem Gemisch aus 90 % Luft und 10 % CO_2 begast wurde. Der CO_2 -Inkubator war notwendig, um eine pH-Verschiebung des Mediums zu vermeiden.

1.7 Behandlung der Filter nach Abschluß der Zellwanderung:

Nach Ablauf der 90-minütigen Inkubation stellten wir die Kammern in einen Kühlschrank um die Zellen abzukühlen und dadurch die Wanderung zu stoppen. Diese Handhabung sorgte bei großer Kammerzahl für ein genaueres Ergebnis.

Dann wurden die Filter aus den Kammern genommen und in einen Färbekasten gelegt.

Um die Einwanderungstiefe der Zellen unter dem Mikroskop bestimmen zu können, mußten die Filter durchsichtig gemacht und die Zellen im Filter gefärbt werden. Dazu wurden die Filter mit verschiedenen Lösungen nach folgendem Schema behandelt:

1. 5 sec in 100 % Propanol
2. 4 min in einer Lösung aus 96 % Harris Hämatoxilin und 4 % Eisessig (96 Teile Harris-Hämatoxilin und 4 Teile Eisessig)
3. in aqua dest. spülen
4. 3 min in 70 % Propanol mit 0,01 m HCl

5. in aqua dest. spülen
6. 3 min in "blueing agent"
7. in aqua dest. spülen
8. 3 min in 70 % Propanol (aus 100 % Propanol mit H_2O hergestellt)
9. 3 min in 90 % Propanol (aus 100 % Propanol mit H_2O hergestellt)
10. 3 min in 100 % Propanol
11. 3 min in 100 % Propanol
12. 3 min in 100 % Xylol

Die erste Hälfte der Färbereihe bis zum Blueing agent führte zu einer Kernfärbung der Zellen. Die Propanolreihe verdrängte das Wasser aus den Filtern. Dies war Voraussetzung für die Klärung des Filters, die durch Xylol erreicht wurde.

Nach dieser Prozedur wurden die Filter in einen Kanadabalsamtropfen, der auf einem Objektträger aufgebracht wurde, eingebettet.

1.8 Auswertung der Filter:

Wir werteten die Filter nach der "leading front"-Methode aus (38,5.50-52).

Hierbei betrachteten wir die Filter bei 400-facher Vergrößerung durch ein Mikroskop. Durch Drehen an der Mikrometerschraube konnte man verschiedene Ebenen im Filter scharf einstellen. Da die Mikrometerschraube skaliert war, war die Messung des Abstandes von zwei Zellen, die sich in verschiedenen Ebenen befanden, möglich. Bei dem von uns benutzten Zeissmikroskop entsprach ein

Skalenteil einem Mikrometer.

Zur Messung der Einwanderungstiefe der Zellen bewegte man sich optisch durch Drehen der Mikrometerschraube von der Filterunterseite aus auf die eingewanderten Zellen zu. Gemessen wurde nun der Abstand zwischen den ersten beiden Zellen die gleichzeitig in einer Ebene erschienen und der Hauptebene. Die Hauptebene war die Filteroberseite, auf der die Zellen aufgebracht wurden. Sie war leicht erkennbar, da hier die meisten Zellen lagen. Nur etwa 30 Prozent der Zellen, die auf den Filter aufgebracht wurden, wanderten in ihn ein. Diese Messung führten wir jeweils an vier verschiedenen Stellen auf dem Filter durch und berechneten dann den Durchschnitt dieser Werte.

2. Markierung von Kasein mit ^{125}Jod

Wir markierten jeweils 10 mg Kasein mit 2 mCi ^{125}Jod . Dies geschah nach dem Verfahren von MacConahey und Dixon (22). Zunächst wurden zusammenpipettiert:

1700 μl 0,15 M NaPO_4 - Puffer (pH 7)

40 μl ^{125}Jod (in 0,1 N NaOH)

Das pH wurde mit 0,1 N HCl auf 7 eingestellt. (Kontrolle mit pH-Papier)

Danach wurden dazugemischt:

200 μl Kasein (50 mg/ml PBS)

1000 μl Chloramin T (100 $\mu\text{g/ml}$ H_2O)

Diese Lösung wurde 10 min lang unter Rühren bei 0 ° C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von

1000 μ l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ gestoppt. Das entstandene Gemisch dialysierten wir über Nacht gegen PBS. 10 μ l der entstandenen ^{125}Jod -Kaseinlösung zeigten bei beiden Präparationen eine Aktivität von 20.000 cpm; dies entsprach 2,5 μCi pro mg Protein. Die radioaktiven Messungen wurden in einem Gamma-Counter der Fa. Berthold, Wildbad durchgeführt.

3. Abbauen von filtergebundenem Kasein mittels Papain

Hierzu nahmen wir Filter, die in einer ^{125}Jod -Kaseinlösung (2,5 mg/ml) gebadet und dann mit der Filternutsche gewaschen worden waren. Diese Filter wurden für 20 min bei 37 ° C in Lösungen steigender Papainkonzentrationen gelegt. Die Aktivierung des Papains erfolgte durch Zugabe von Cystein (0,01 M). Beendet wurde die Reaktion durch Waschung der Filter in der Filternutsche. Wir variierten für diesen Versuch die Papainkonzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-2} mg Papain pro ml Medium. Nach der Inkubationszeit maßen wir die ^{125}Jod -Aktivität in den Überständen, so daß die Menge an freigesetzten Kaseinmaterial errechenbar war.

4. Untersuchung von Filterquerschnitten

Zusätzlich werteten wir Filter so aus, daß wir die einzelnen Zellen und ihre Bewegungen und Verteilung im Filter beurteilen konnten. Dies erreichten wir, indem wir die Filter vertikal in Scheibchen schnitten und dann mit Hilfe eines Einbettungsmittels (Tissue-Tec) aufeinanderklebten. Im Kryostaten wurden bei -18 Grad Celsius 5 μm dicke

Schnitte hergestellt. Diese wurden auf einen Objektträger aufgebracht und dann je nach Vorbehandlung der Filter nach Giemsa gefärbt, oder es wurde eine Autoradiographie mit ihnen durchgeführt.

5. Autoradiographie

^{125}Jod -kaseinbesetzte Filterscheibchen ($5\text{ }\mu\text{m}$ dick), in die Zellen eingewandert waren, wurden in einer Dunkelkammer mit einem gammastrahlensensiblen Film (Kodak RPX-omat royal) für 10 Tage bedeckt. Danach wurde der Film entwickelt und unter dem Mikroskop betrachtet.

6. Besetzung von Filtern mit FITC-markierten Antikörpern

Wir inkubierten Filter in einer Lösung mit FITC-markierten IgG Antikörpern ($2,5\text{ mg/ml}$ Medium) für 30 min bei 63°C , so daß die Antikörper im Filter aggregierten. Eine besondere Spezifität der Antikörper war bei diesen Versuchen nicht erforderlich.

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Etablierung von Referenzwerten mit Hilfe des Standardchemotaxistests

Beim Standardversuch werden die Kammern so benutzt, daß unter den Filter 1 ml eines Chemotaxans (in Medium) injiziert wird. Auf die Filter wird 1 ml Zellsuspension pipettiert. Vor der Injektion der Flüssigkeit in die untere Kammer sind im Standardversuch die Filter trocken, so daß die Luft durch den porösen Filter entweichen kann. Wir untersuchten die Abhängigkeit der Einwanderungstiefe der Zellen von der im unteren Kompartiment eingesetzten Chemotaxansmenge. Hierbei variierten wir die Konzentration des Chemotaxans, bei diesen Versuchen Kasein, von 0 - 4,5 mg pro ml Medium.

Hieraus ergab sich die in Abb. 3 wiedergegebene Kurve, die sich in zahlreichen Versuchen reproduzieren ließ.

Eine gewisse Mindestmenge an Kasein im unteren Kompartiment wurde benötigt, um die Zellen überhaupt zur Migration anzuregen. Diese Mindestmenge war geringer als 0,5 mg Kasein. Zu beachten war, daß die Konzentration des Chemotaxans an der Unterseite des Filters größer war als an der Oberseite, da sich im Filter ein Konzentrationsgefälle ausbildet.

Die Kontrolle in diesem Versuch lag bei 12,5 μ m.

Die Kontrolle wurde so ausgeführt, daß das Kasein fortgelassen, aber alle sonstigen Versuchsbedingungen beibehalten wurden. Dadurch war sichergestellt, daß die

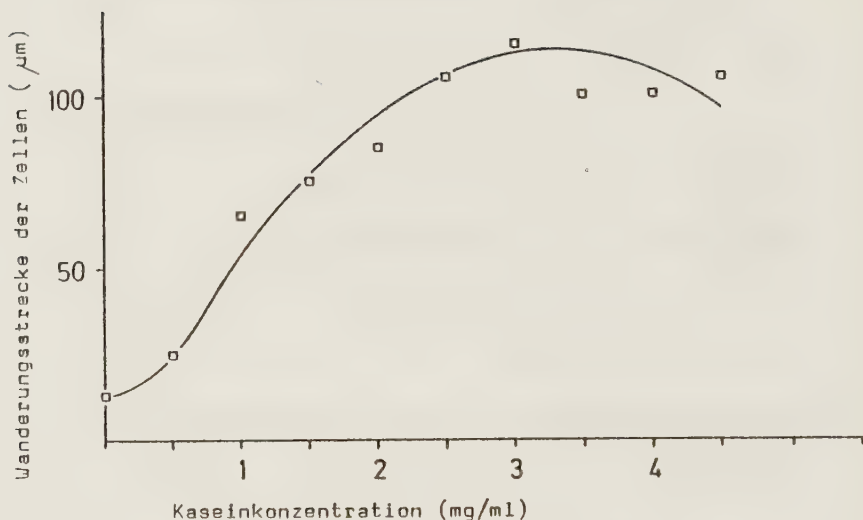


Abb. 3 - Standardchemotaxisversuch:

Das Diagramm zeigt die Einwanderungstiefen der Zellen (leading front) in Abhängigkeit von der eingesetzten Kaseinkonzentration.

Bei diesem Versuch wurden in die unteren Kammeranteile Lösungen mit steigenden Chemotaxankonzentrationen injiziert. Die Versuche wurden mit je 2 Millionen Zellen durchgeführt. Die Inkubationszeit der Kammern betrug 90 min bei 37 Grad Celsius.

über die Kontrollwerte hinausgehende Migration nur durch die Chemotaxanslösung und nicht durch sonstige Einwirkungen hervorgerufen wurde.

Dieser Kontrollversuch war niemals vollständig negativ. Es zeigte sich immer eine Migration von 10 - 25 μ m. Diese Migration, die immer auftrat, wenn die Zellen überhaupt imstande waren sich zu bewegen, wird als "random motility" (18) bezeichnet.

B. Rolle von homogen im Filter gebundenem Kasein für die Migration von Leukozyten

B 1. Vorversuche zur Zellmigration mit kaseinverinkubierten und gewaschenen Filtern

Um das Phänomen der Wanderung von Zellen näher kennenzulernen, begannen wir die dazu notwendigen Voraussetzungen genauer zu untersuchen.

Dazu legten wir zwei Filter für 30 min in je 1 ml Medium, in welchem wir jeweils 2,5 mg Kasein gelöst hatten. Nach dem Einsetzen dieser beiden Filter in Kammern (Kammer 1 u. 2), wurde in die unteren Kammeranteile chemotaxansfreies Medium injiziert.

Auf die Filter pipettierten wir, wie bei der Standardbehandlung der Kammern, die Zellsuspension.

Zwei weitere Kammern wurden wie im Standardversuch behandelt (Kammer 3 u. 4), wobei wir jeweils 2,5 mg Kasein in den unteren Kammeranteil injizierten. Zur Kontrolle wurde ein Filter nur in Medium gebadet. (Kammer 5).

Es ergaben sich folgende Wanderungsstrecken:

Migrationstrecken:

Kammer 1	125 μ m
Kammer 2	120 μ m
Kammer 3	130 μ m (Standardchemotaxis)
Kammer 4	125 μ m (Standardchemotaxis)
Kammer 5	15 μ m (Mediumkontrolle)

Das Ergebnis war überraschend. Das Kasein, welches sich in den Poren der Filter befand, ermöglichte den Zellen offensichtlich eine gleich gute Wanderung in den Filtern, wie das gesamte, im Standardversuch im unteren Kompartiment befindliche Kasein. Dies erschien unwahrscheinlich, da man annehmen sollte, daß das über und unter dem Filter befindliche Medium die Chemotaxanskonzentration im Filter sehr schnell vermindern würde, wodurch sich dann die Eindringtiefe der Zellen im Filter wesentlich verringern sollte.

Die einfachste Erklärung dafür, daß dies nicht der Fall war, war die Annahme, daß sich ein Teil des Kaseins bei der Filterinkubation an diesen gebunden hatte, und daß diese gebundenen Chemotaxansmoleküle für die Migration verantwortlich waren.

Bei dem folgenden Versuch verschärften wir die Versuchsbedingungen, indem wir nach dem Baden die Filter für 12 Stunden in 20 ml isotoner Lösung legten. Hätte sich das Chemotaxans noch in freier Form im Filter befunden, so wäre es in dieser Zeit herausdiffundiert (Kammer 1 u. 2).

Die Behandlung der Filter für die Kammern 3, 4, 5 änderte sich nicht.

igrationsstrecke:

Kammer 1	105 μm
Kammer 2	107 μm
Kammer 3	110 μm (Standardchemotaxis)
Kammer 4	115 μm (Standardchemotaxis)
Kammer 5	12,5 μm (Mediumkontrolle)

Dies Ergebnis war zum vorangegangenen Versuch fast unverändert. Unterschiede von 10 μm liegen im Bereich der Ungenauigkeit der Methode.

Nach diesen Versuchen schien es wahrscheinlich, daß sich Kasein bei der Inkubation an die Filter band und daß die Migration von Leukozyten auch durch gebundenes Kasein induziert werden konnte.

Zwecks Prüfung, ob nichtgebundenes Material bei der Migration überhaupt eine Rolle spielte, verschärften wir die Versuchsbedingungen noch weiter. Nachdem wieder Filter für 30 min in Kaseinlösungen (25 mg/ml Medium) gelegt worden waren, setzten wir sie in eine Filternutsche ein und saugen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe 25 ml PBS hindurch, um somit auch das nicht fest gebundene Kasein aus dem Filter herauszuspülen.

Die Leukozyten wanderten dennoch 100 μm tief in die Filter ein. Damit war gezeigt, daß für die Migration von Zellen in derartige Filter kein freies Kasein benötigt wurde.

B 2. Variation der Zeit der Vorinkubation von Filtern in Kaseinlösungen

Um das Verhalten von Kasein in den Filtern genauer zu ergründen, prüften wir, wie lange man die Filter der Kaseinlösung bei Raumtemperatur aussetzen mußte, bis sich das Kasein gebunden hatte.

Wir legten die Filter für 5 sec, 5 min, 15 min und 30 min in die Kaseinlösung (2,5 mg Kasein/ml Medium), dann wuschen wir sie in der Filternutsche und prüften sie auf ihre Fähigkeit, Leukozyten zur Einwanderung anzuregen.

	Zeit in der Kaseinlösung	Migrations- strecke
Kammer 1	5 sec	75 μ m
Kammer 2	5 min	100 μ m
Kammer 3	10 min	100 μ m
Kammer 4	15 min	110 μ m
Kammer 5	30 min	100 μ m
Kammer 6	- - -	10 μ m

Bei Kammer 6 handelt es sich um die Kontrolle, bei der der Filter für 30 min in Medium lag.

Auf Grund dieses Ergebnisses legten wir die Filter nur noch für jeweils 10 min in die Kaseinlösung.

B 3. Untersuchung der Bindung von 125 Jod markiertem Ka- sein an Filter

Um eindeutig zu beweisen, daß die Filter auch tatsäch-

lich Kasein zu binden vermochten, benutzten wir ^{125}Jod markiertes Kasein. Gleichzeitig war damit eine Quantifizierung der Kaseinbindung möglich.

Wir badeten die Filter in Lösungen mit steigenden Konzentrationen von ^{125}Jod -Kasein für 10 min bei Raumtemperatur. Die so gebadeten Filter wuschen wir mit der Filternutsche, wie schon beschrieben. Wir maßten im folgenden die am Filter gebundene Radioaktivität und rechneten sie in die entsprechende Proteinmenge in Milligramm um (Abb. 4). Bei dieser Art von Versuchen zeigte es sich, daß wir bis 40 mg angebotenen Kaseins nicht in der Lage waren, die Filter mit Kasein zu sättigen. Bei 40 mg Kasein pro ml Medium banden sich 0,3 mg Kasein an den Filter (Abb. 4 zeigt die Kurve bis 5 mg Kasein/ml Medium).

B 4. Erstellung von Referenzwerten für die Migration von Zellen in chemotaxansbesetzten Filtern

Nachdem die Bindung des Kaseins erwiesen und das Bindungsverhalten des Kaseins am Filter aufgezeigt war, gingen wir an die Ermittlung von Referenzwerten für die Migration von Zellen auf filtergebundenem Chemotaxans. Hierzu badeten wir die Filter wieder in Kaseinlösungen steigender Konzentrationen, wuschen sie in der Filternutsche und setzten sie so in die Kammern ein. Die unteren Kompartimente beschickten wir mit Medium (Abb. 5).

Es zeigte sich, daß auch hier die Einwanderungstiefe der Zellen von den am Filter gebundenen Kaseinkonzentrationen abhing. Je dichter die Chemotaxansmoleküle saßen,

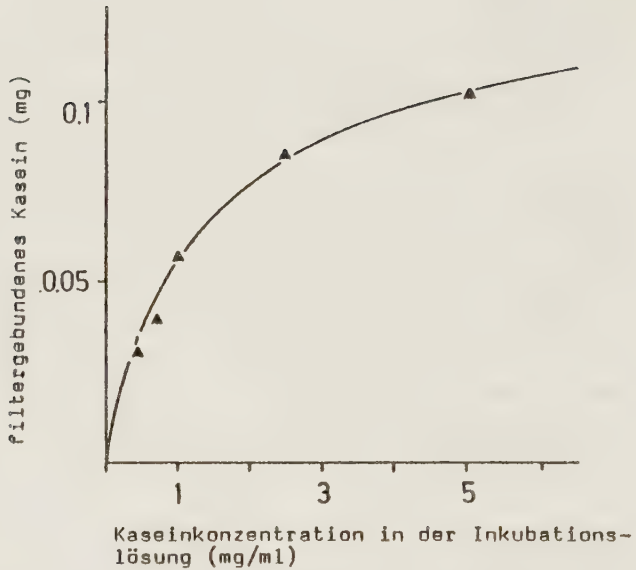


Abb. 4 - Bindung von ^{125}I Jod markiertem Kasein an Filter:

Bei diesem Versuch wurden die Filter für 10 min in Lösungen mit steigender Konzentration an ^{125}I Jod-Kasein gelegt. Nach Waschung der Filter in einer Filternutsche mit 25 ml PBS wurde die gebundene Aktivität gemessen und in mg Protein umgerechnet.

Das Diagramm zeigt die gebundene Proteinmenge in Abhängigkeit von der zur Filterinkubation verwendeten Kaseinkonzentration.

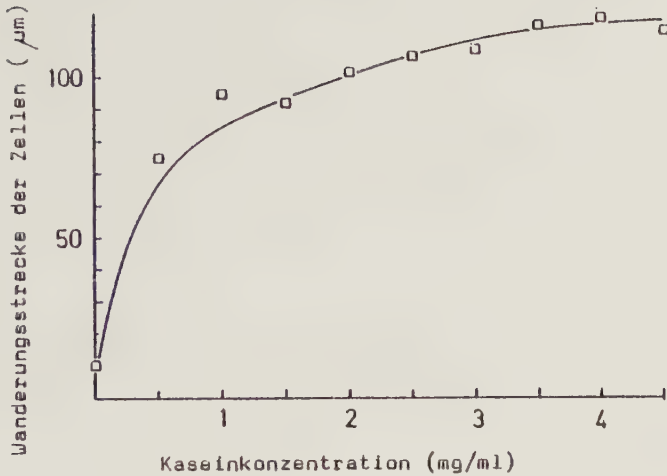


Abb. 5 - Migration in kaseinvorinkubierten und gewaschenen Filtern:

Hierbei wurden die Filter für 10 min in Lösungen steigender Kaseinkonzentrationen gelegt, in einer Filternutsche mit 25 ml PBS gewaschen und dann in Kammern eingesetzt. Die unteren Kammeranteile wurden nur mit Medium gefüllt. Die Versuche wurden mit jeweils 2 Millionen Granulozyten durchgeführt.

Das Diagramm zeigt die Einwanderungstiefen der Zellen in Abhängigkeit von den Kaseinlösungen, in denen die Filter vorinkubiert wurden.

desto stärker migrierten die Zellen. Es sieht jedoch so aus, als würde die Kurve einem Migrationsmaximum zustreben, das bei etwa 4 mg erreicht wird (Abb. 5).

Da bei 4 mg Kasein pro ml Medium das Bindungsvermögen der Filter für Kasein noch nicht ausgeschöpft war, mußte die Grenze der Migrationsgeschwindigkeit durch das mangelnde Vermögen der Zellen, mehr gebundenes Chemotaxans zu weiterer Wanderung zu nutzen, gegeben sein.

Vergleicht man die Migration von Zellen im Standardtest und die Migration von Zellen in Filtern die mit Chemotaxans besetzt waren, so fallen Unterschiede im vorderen und hinteren Kurvenabschnitt deutlich auf (Abb. 6). Die beiden Kurven beginnen sehr verschieden. Die Kurve der Migration im Standardverfahren beginnt sigmoidförmig, während die Kurve der gewaschenen Filter gleich sehr steil beginnt. Dieser Unterschied dürfte durch die unterschiedliche Kaseinverfügbarkeit in beiden Ansätzen erklärbar sein. Die gewaschenen Filter hatten an jedem Ort im Filter die gleiche Kaseinkonzentration; auch auf der Filteroberseite wo die Zellen aufgebracht wurden und wo sie ihre Wanderung begannen. Bei den standardbehandelten Filtern gilt dagegen die allgemeine Annahme, daß sich ein Gradient aufbaut. Die Konzentration war auf der Filteroberseite geringer, als auf der Unterseite. Entsprechend wurden die Zellen auch erst später und schwächer zur Migration angeregt. Dies könnte die bessere Migrationsrate bei geringen Kaseinkonzentrationen durchaus erklären.

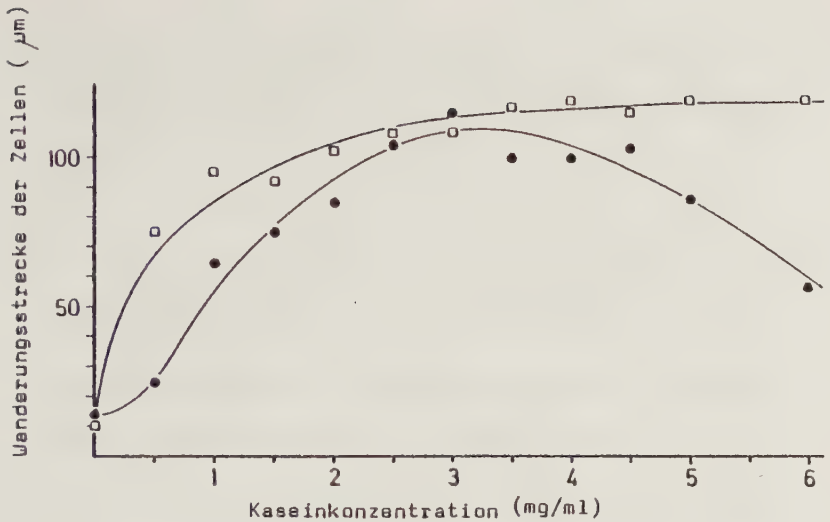


Abb. 6 - Vergleich der Migration von Zellen im Standardtest (Kasein im unteren Kompartiment) und im Test mit chemotaxansbesetzten Filtern:

Bei der unteren Kurve (-●-●-) handelt es sich um die Standardmigrationskurve, wie sie auch in Abb. 3 dargestellt ist. Die obere Kurve (-□-□-) ist die Kurve der gewaschenen Filter (Siehe Abb. 5). Der Unterschied zwischen beiden Kurven besteht darin, daß bei der Standardkurve (-●-●-) das Chemotaxans in das untere Kammerkompartiment gegeben wurde, während bei der anderen Kurve (-□-□-) die Filter in Chemotaxans gebadet und dann gewaschen wurden. Bei dieser Kurve befindet sich im unteren Kompartiment der Kammern kein Chemotaxans. In den Filtern der unteren Kurve (-●-●-) befindet sich während des Versuchs demnach mindestens genausoviel Kasein wie in den vorbehandelten Filtern (-□-□-).

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit war es, eine Erklärung dafür zu finden, daß die Standardmigrationskurve bei 3 mg Kasein/ml Medium ein Maximum durchlief und dann abfiel, während die Kurve der gewaschenen Filter auf dem gleichen Niveau blieb.

Bei der Standardmigrationskurve war mindestens gleich viel Kasein am Filter gebunden, wie bei der Kurve der Migration in gewaschenen Filtern. Zusätzlich befanden sich in den Kammern, die nach dem Standardverfahren behandelt wurden, auch noch freie, nicht am Filter gebundene Kaseinmoleküle. Sie diffundierten auch in das obere Kammerkompartiment. Ab einer Schwellenkonzentration, die am höchsten Punkt der Standardkurve erreicht war, wurden diese Moleküle zu einer Behinderung für die Migration der auf dem Filter befindlichen Zellen.

Diese Behinderung der Zellen könnte dadurch zustande kommen, daß ein Teil ihrer Rezeptoren durch freies Kasein besetzt wird und dadurch nicht für den Migrationsprozeß zur Verfügung steht. In diesem Fall würde sich ab einer bestimmten Kaseinkonzentration ein Gleichgewicht zwischen besetzten und unbesetzten Zell-Rezeptoren ausbilden, so daß die Behinderung der Migration ein gewisses Maß nicht überschreiten könnte.

Eine andere Möglichkeit wäre die, daß das freie Kasein einen toxischen Effekt auf die Zellen ausübt und so ihre Migration hemmt.

Der Umstand, daß die Migration in gewaschenen Filtern immer stärker war als im Standardtest, zeigte, daß gelöstes Chemotaxans keine, die Wanderung fördernde Rolle spielte.

B 5. Wirkung der proteolytischen Abdaunung des filtergebundenen Kaseins auf die kaseininduzierte Leukozytenmigration

Hängt die Beweglichkeit von Zellen in Filtern von im Filter gebundenen Molekülen ab, so müßte durch Entfernung dieser Moleküle die Migration hemmbar sein.

Wir präparierten eine Anzahl von Filtern, indem wir sie für 10 min in 2,5 mg Kasein pro ml Medium badeten und mit der Filternutsche wuschen. Diese Filter inkubierten wir sodann in Lösungen mit verschiedenen Papainkonzentrationen bei 37 ° C für 20 min. Die Reaktion wurde beendet durch Waschung der Filter.

Danach setzten wir die in Papain inkubierten Filter in Kammern ein und prüften mit je 2 Millionen Zellen die Migration (Abb. 7). Die Zellmigration konnte mit Papain bis auf das Niveau der "random motility" gehemmt werden.

Daß es sich bei der Hemmung der Migration nicht um eine Wirkung des Papains auf die Zellen handelte, zeigten wir, indem wir kaseinbesetzte Filter in einer Papainlösung (1mg/ml) badeten, die Filter dann wuschen und im Migrationsversuch testeten. Bei diesem Versuch gaben wir kein Cystein hinzu, um das Papain nicht zu aktivieren.

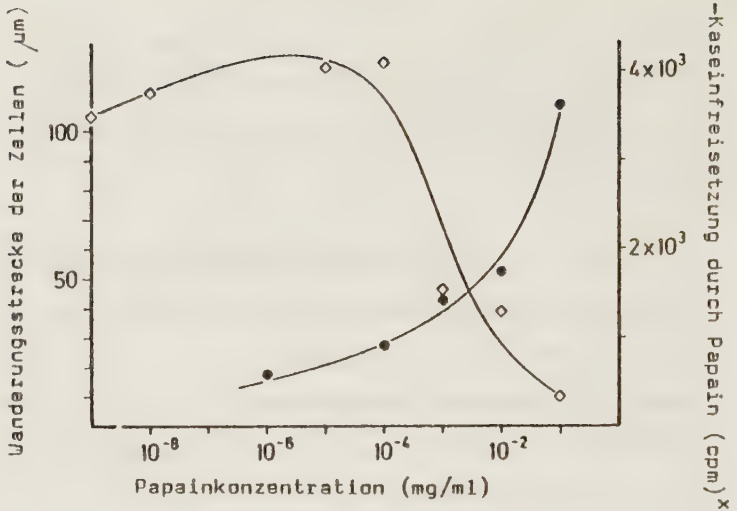


Abb. 7 - Hemmung der Migration von Granulozyten in ¹²⁵Jod kaseinbesetzten Filtern durch Vorbehandlung dieser Filter mit Papain; Messung des freigesetzten ¹²⁵Jod-Kasein:

In 2,5 mg ¹²⁵Jod-Kasein inkubierte (10 min), dann gewaschene Filter wurden für 20 min in Lösungen steigender Papainkonzentrationen bei 37 ° C gelegt. Wir maßen die im Überstand auftauchende ¹²⁵Jod-Aktivität, wuschen die Filter und setzten sie in Chemotaxanskammern.

Die rechte Diagrammseite (-●-●-) zeigt die freigesetzte ¹²⁵Jod-Kasein Menge in Abhängigkeit von der benutzten Papainkonzentration.

Die linke Diagrammseite (-◇-◇-) zeigt die Einwanderungstiefen der Zellen in Abhängigkeit von den eingesetzten Papainkonzentrationen.

$$\times 2 \times 10^3 \text{ cpm} = 0,025 \text{ mg Kasein}$$

Die Migration in diesem Filter betrug $80\text{ }\mu\text{m}$. Die Kontrollen zeigten $110\text{ }\mu\text{m}$ Wanderungsstrecke. Die Differenz ist unserer Meinung nach durch die geringe Menge Cystein zu erklären, die sich in dem von uns benutzten Medium befand und eine kleine Menge Papain aktivierte.

Ein weiterer Kontrollversuch bei dem kaseinbesetzte Filter in $0,01\text{ M}$ Cystein inkubiert wurden, zeigte keine Beeinträchtigung der Migration.

Nachdem nun gezeigt war, daß die in Abb. 7 dargestellte Migrationsminderung durch Einwirkung des Papains auf das Kasein zustande kam, schien es uns wahrscheinlich, daß die Zellmigration von filtergebundenem Chemotaxans abhängig war.

Um festzustellen, ob Kaseinmaterial abgedaut wurde, wiederholten wir mit markiertem Kasein den vorhergehenden Versuch. Wir maßen nach der Inkubation der Filter in den Papainlösungen die Aktivitäten in den Überständen (Abb. 7). Es zeigte sich, daß die abgespaltenen Kaseinbruchstücke zu einem großen Teil freigesetzt und nicht etwa gleich wieder am Filter gebunden wurden.

C. Versuche zur Eigenbeweglichkeit von Leukozyten

Auch ohne daß sich ein Chemotaxans in einem Filter befindet, bewegen sich die Zellen ein Stück in die Filter. Diese Eigenbeweglichkeit wird als "random motility" bezeichnet (18). Sie tritt immer auf. Bei unseren Versuchen betrug die "Eigenbeweglichkeit" zwischen 10 und 25 μm .

Diese Eigenbeweglichkeit der Zellen ohne äußeren Reiz ist von der auf die Filter aufgebraachten Zellzahl abhängig, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist:

Zellzahl $\times 10^6$	Eigenbeweglichkeit
1,5	10 μm
2	15 μm
20	50 μm

Damit erhob sich die Frage, ob ein Teil der Zellen nach der Gewinnung einen gewissen Aktivitätszustand besitzt, der zu dieser Eigenbeweglichkeit führt, oder ob die Reizung der Zellen Voraussetzung ist.

Träfe letztere Möglichkeit zu, so bliebe die Frage nach dem Ursprung eines adäquaten Reizes: Handelte es sich um einen von außen zugeführten Reiz, oder beeinflussten sich die Zellen möglicherweise sogar gegenseitig?

Denkbar war, daß diese Aktivierung noch von den Maßnahmen zur Gewinnung der Leukozyten aus dem Intraperitonealraum des Meerschweinchens herrührte. Wäre das der Fall gewesen, so müßten wir die Zellen möglicherweise zusätzlich im Sinne der Eigenbeweglichkeit stimulieren können.

Diese Stimulierung versuchten wir mit Kasein zu erreichen, indem wir 20 Millionen neutrophile Leukozyten (in 1 ml Medium) bei 37°C 20 min mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Kasein (50 mg/ml) inkubierten, dann zweimal wuschen und ihr Vermögen prüften, in mediumbehandelte Filter einzudringen. Diese Leukozyten erreichten, wie die nicht vorinkubierten Zellen in Vergleichskammern, $50\text{ }\mu\text{m}$ Eindringtiefe.

Durch Kasein konnten wir die Zellen also nicht zusätzlich aktivieren.

Zum Vergleich machten wir den gleichen Versuch mit Beriglobin. Beriglobin selbst ist chemotaktisch wirksam. Bei Zugabe von $1,25\text{ mg}$ Beriglobin in den unteren Kammerteil ergab sich bei 20 Millionen Zellen auf dem Filter eine Eindringtiefe von $100\text{ }\mu\text{m}$. Die Zellen im Kontrollfilter, bei dem in den unteren Kammeranteil nur Medium injiziert worden war, wanderten $50\text{ }\mu\text{m}$ tief ein.

Inkubierten wir nun je 20 Millionen Zellen mit 3 mg Beriglobin für 5, 10 und 30 min bei 37°C , wuschen sie zweimal in Medium und gaben diese Zellen dann auf Filter in Kammern, in deren unterem Teil nur Medium injiziert worden war, so ergaben sich folgende Ergebnisse:

	Vorbehandlung der Zellen	Wanderungs- strecken
Kammer 1	5 min	$50\text{ }\mu\text{m}$
Kammer 2	10 min	$45\text{ }\mu\text{m}$
Kammer 3	30 min	$35\text{ }\mu\text{m}$
Kammer 4	30 min	$50\text{ }\mu\text{m}$ (Kontrolle)

Das Ergebnis zeigt, daß auch mit Beriglobin eine zusätz-

liche Aktivierung nicht möglich war. Es trat sogar ein gegenteiliger Effekt ein. Die durch die "random motility" verursachte Wanderungstrecke verringerte sich.

Nach diesen vergeblichen Versuchen einer Steigerung der "random motility" durch exogen zugeführte Reize haben wir untersucht, in wieweit sich die Zellen selber gegenseitig beeinflussen können. Dabei war vor allem an eine Beeinflussung mittels löslicher Faktoren zu denken.

Die Versuche mit Kasein legten nahe, daß Kasein am Filter gebunden vorlag, wenn es eine Steigerung der Migration bewirkte. Es bot sich daher an, ein entsprechendes Wirkungsprinzip auch für die hypothetischen Substanzen der Granulozyten anzunehmen. Wir versuchten daher, solche hypothetischen Substanzen von Granulozyten zu gewinnen, sie gegebenenfalls an Filter zu binden, um dann ihren Effekt zu verfolgen.

Dies testeten wir, indem wir 30 Millionen Zellen in einem Millimeter Medium für 90 min bei 37 ° C inkubierten, den Überstand nahmen und ihn mit 2 Millionen gewaschenen Zellen zusammen in einer Chemotaxanskammer auf seine chemotaktische Potenz prüften. Diese Zellen wanderten bis zu 45 μ m in den Filter, während die Kontrolle 20 μ m erbrachte. Wir untersuchten dieses Phänomen noch näher, indem wir Zellsuspensionen unterschiedlicher Konzentration (2×10^6 bis 20×10^6 pro ml Medium) bei 37 ° C für 90 min inkubierten. Die Überstände wurden durch Abzentrifugieren der Zellen gewonnen und zur Inkubation von Filtern benutzt. Danach wurden die Filter gewaschen und

im Vergleich zu Kontrollfiltern getestet, die nur mit Medium in Kontakt gebracht worden waren. Der Test erfolgte in typischer Weise mit Medium im unteren Kammeranteil und Zellen auf den Filtern.

Wie Abb. 8 zeigt, bot der mediumbehandelte Filter die übliche Einwanderungstiefe. Mit zunehmenden Zellkonzentrationen stieg die Fähigkeit der Supernate die Filter so zu verändern, daß die Wanderung gefördert wurde: 5 μm über die Kontrolle hinaus bei dem Supernat von 2×10^6 und 30 μm bei 20×10^6 Zellen pro ml Medium.

Damit glauben wir gezeigt zu haben, daß die Zellen Substanzen ausscheiden, die geeignet sind, ihnen selbst als Basis für Bewegungen im Filter zu dienen.

D. Rolle von freiem Kasein für die Leukozytenmigration

D 1. Versuche zur Migration von Leukozyten bei Zugabe des Chemotaxans zur Zellsuspension

Um die Bedeutung des freien Kaseins zu ergründen, machten wir eine Versuchsreihe, bei der wir die Kammern wie beim Standardversuch vorbereiteten, dann aber das Chemotaxans nicht unten in die Kammern gaben, sondern es zu den Zellen in den oberen Kammeranteil pipettierten. Bei diesem Versuch steigerten wir die Kaseinkonzentrationen in 0,25 mg Schritten.

Das Ergebnis war eine Kurve (Abb. 9) die bei geringer Kaseinkonzentration sehr stark anstieg, dann aber bis auf 50 μm bei 2,5 mg Kasein abfiel. Der Gipfel war bei 0,5 mg Kasein mit 90 μm Einwanderungstiefe erreicht.

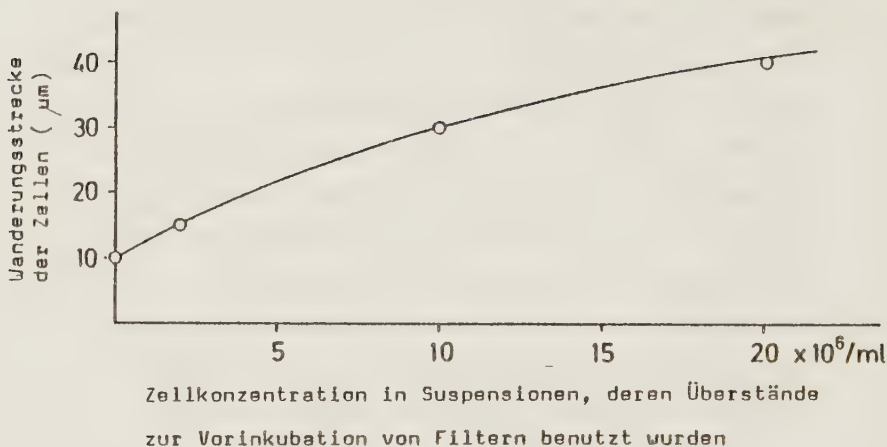


Abb. 8 - Steigerung der "random motility" durch Inkubation von Filtern in Zellüberständen:

Bei diesem Versuch wurden unterschiedliche Zellmengen für 90 min bei 37°C inkubiert und dann abzentrifugiert. Die Überstände wurden zur Inkubation von Filtern verwendet. Diese Filter wurden in Kammern gespannt und die Migration von aufgebrachten Zellen geprüft, ohne daß ein Chemotaxans hinzugegeben wurde.

Das Diagramm zeigt die Einwanderungstiefe von Granulozyten (leading front) in Abhängigkeit von den Zellkonzentrationen, deren Überstände zur Filterinkubation verwendet wurden.

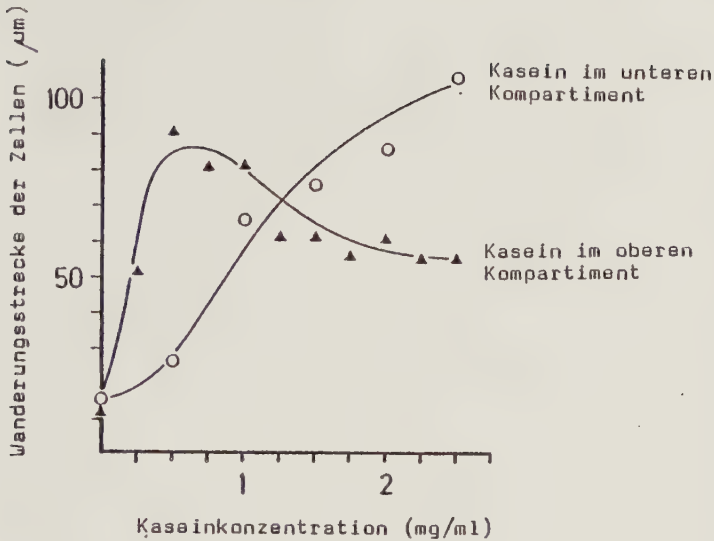


Abb. 9 - Migration von Granulozyten bei Zugabe des Chemotaxans zur Zellsuspension ($-\blacktriangle-\blacktriangle-$), im Vergleich zur Standardchemotaxiskurve ($-O-O-$):

Bei diesem Versuch wurde das Chemotaxans nicht, wie bei den vorherigen Versuchen, in das untere Kompartiment oder in den Filter direkt gebracht, sondern zur Zellsuspension gegeben.

Das Diagramm zeigt die Einwanderungstiefen der Zellen in Abhängigkeit von der im oberen Kompartiment befindlichen Kaseinkonzentration ($-\blacktriangle-\blacktriangle-$). Im Vergleich hierzu ist der Beginn der Standardchemotaxiskurve noch einmal eingezeichnet.

Wie dieser steile Anstieg der Kurve im Vergleich zur Standardmigration zustande kam, ergibt sich leicht daraus, daß das Kasein schon beim Beginn des Versuchs an der Filteroberseite gebunden war, so daß die Zellen gleich die maximale Kaseinkonzentration am Filter gebunden vorfanden. Entsprechend sieht der Beginn dieser Kurve dem Beginn der Kurve für die Migration von Zellen in gewaschenen Filtern sehr ähnlich (vgl. Abb. 5).

Wodurch wurde nun der Abfall der Kurve ab 0,75 mg Kasein im oberen Kompartiment hervorgerufen? Hierzu gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Einmal könnte es sein, daß dieser Abfall durch den negativen Gradienten, der sich im Filter aufgebaut haben dürfte, verursacht wurde. Je höher die Kaseinkonzentration im oberen Teil der chemotaktischen Kammer, desto mehr Kasein dürfte sich einerseits in den Filter hineinbewegt haben, desto stärker dürfte andererseits aber auch der Konzentrationsabfall und damit der Gradient im Filter gewesen sein.

Unter der Annahme, daß sich die Zellen nach der höheren im Filter gebundenen Konzentration hin ausrichten, würde dieser negative Gradient die Migration der Zellen in die Filter hemmen und dies um so stärker, je steiler der Gradient wäre.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit ergäbe sich durch die Vorstellung, daß freies Kasein die Migration der Zellen behindern würde: Je mehr freies Kasein, desto größer die Behinderung, desto geringer die Migrationsrate.

D 2. Beeinflussung der Migration von Leukozyten auf filtergebundenem Kasein durch zusätzliches, gelöstes Kasein

Bei diesem Versuch wurden zwei Kammerserien benutzt. In jede der beiden Serien setzten wir die gleichen, in steigenden Kaseinkonzentrationen gebadet und dann mit der Filternutsche gespülten Filter (Abb. 10) ein.

Eine Kammerserie wurde unten nur mit Medium gefüllt, so daß die gleiche Versuchsanordnung entstand, wie wir sie schon bei den gewaschenen Filtern beschrieben haben.

Bei der zweiten Kammerserie injizierten wir unten hinein zusätzlich noch je 2,5 mg Kasein.

Wir gingen dabei von folgender Überlegung aus: Spielt der Gradient, der sich durch den gesamten Filter aufbaut hat, eine positive Rolle, so muß die Migrationskurve mit dem freien Kasein in jedem Punkt höher liegen, als die Kurve, die sich aus der Migration nur gewaschener Filter ergibt.

Wie aus der zugehörigen Graphik (Abb. 10) zu ersehen, ist dies aber nicht der Fall. Die Kurven schneiden sich. Die Kurve der Kammern, die zusätzliches Kasein in den unteren Kammeranteil erhielten, begann auf einem höheren Niveau (Erklärung siehe D 3) und schnitt die andere Kurve bei 2,25 mg Kasein. Die Kaseinangaben an der Abszisse der Abbildung beziehen sich auf die Kaseinkonzentrationen, in denen die Filter vor der Waschung gebadet worden waren.

Wichtig ist noch die Frage, warum die Hemmung der Migra-

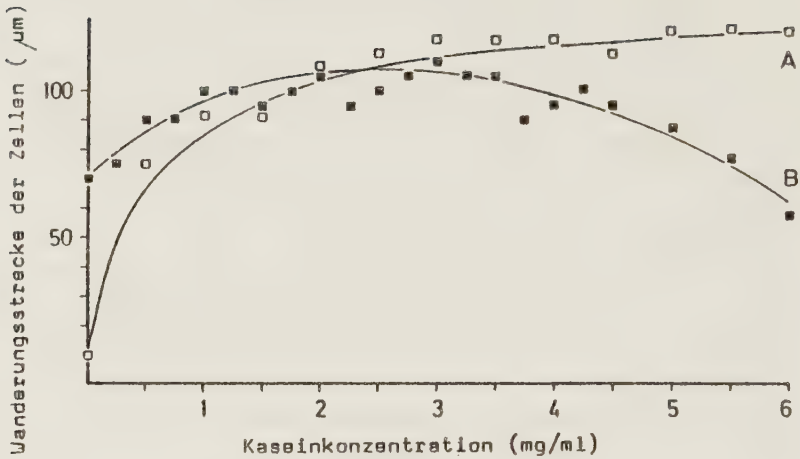


Abb. 10 - Hemmung der Migration von Leukozyten durch gelöstes Chemotaxans:

Die (-□-□-)-Kurve entspricht der Migration in gewaschenen Filtern (Abb. 5). Die andere Kurve (-■-■-) entstand genauso wie die Kurve der Migration in chemotaxansbesetzten Filtern, mit dem Unterschied, daß bei dieser Kurve das untere Kompartiment der Kammern jeweils mit 2,5 mg Kasein pro ml Medium gefüllt wurden.

Das Diagramm zeigt für beide Kurven die Einwanderungstiefen der Granulozyten in Abhängigkeit von der Kaseinkonzentration, in der die Filter vorinkubiert wurden.

tion durch Kasein nicht schon am Beginn der Kurve auftrat, sondern die Migrationsstrecken sogar anstiegen. Der Grund könnte sein, daß unterhalb des Schnittpunktes der Kurven die Filter noch soviel Kasein aus dem Medium adsorbierten, daß dieser Effekt die etwaige Hemmung durch freies Kasein mehr als ausglich. Dieser Zustand änderte sich am Schnittpunkt der beiden Kurven. Von da an überwog der Effekt des freien Kaseins.

D 3. Versuche mit feuchten und trockenen Filtern

Bei Kurve B in Abb. 10, zu deren Ausarbeitung unten Kasein in die Kammern hinzugegeben wurde, fiel auch noch etwas anderes auf. Sie begann bei $70\text{ }\mu\text{m}$. Bei diesem ersten Wert handelte es sich um einen Filter, der nicht mit Kasein vorinkubiert wurde. Mithin lag hier praktisch die gleiche Situation vor wie in der Standardchemotaxis-kurve, nur daß die Standardkurve für 2,5 mg Kasein $120\text{ }\mu\text{m}$ Einwanderungstiefe zeigte (vgl. Abb. 3, S. 20).

Woraus ergibt sich diese Differenz? Es gab bei der Vorbereitung dieser Filterserie im Vergleich zur Standardversuchsanordnung nur den Unterschied, daß die Filter in den Kammern für die Standardchemotaxis-kurve bei Injektion der Kaseinlösung trocken waren, während der erste Filter bei diesem letzten Versuch vorher angefeuchtet wurde um eine völlige Gleichbehandlung der Filter dieser Versuchsreihe zu gewährleisten.

Spielte das vorherige Anfeuchten eine derartige Rolle? Dies klärten wir, indem wir gleichzeitig in je zwei

Kammern vorher angefeuchtete Filter und trockene Filter im Standardtest mit einer Kaseinlösung von 2,5 mg Kasein/ml Medium prüften:

Migrations-
strecke

Kammer 1	60 μ m (angefeuchteter Filter)
Kammer 2	60 μ m (angefeuchteter Filter)
Kammer 3	105 μ m (trockener Filter)
Kammer 4	100 μ m (trockener Filter)
Kammer 5	15 μ m (Mediumkontrolle)

Eine vollständige Erklärung für dieses Phänomen haben wir nicht.

E. Rolle von gebundenen Chemotaxansgradienten für die Leukozytenmigration

E 1. Etablierung des gebundenen Chemotaxansgradienten

Injiziert man in das untere Kompartiment einer Chemotaxis-Kammer eine migrationsfördernde Substanz (Kasein) und füllt auf den Filter ein Medium, so dürfte sich in diesem Filter ein Gradient sowohl von gebundenem, als auch ein Gradient von flüssigem Kasein ausbilden.

Diese zwei Arten von Gradienten im Filter müssen wir gedanklich trennen; sie können sich möglicherweise gegenseitig beeinflussen. Den flüssigen Teil des Gradienten vermögen wir durch Waschen zu eliminieren und können damit an die Untersuchung des festen Teils des Gradienten gehen. Dazu kontrollierten wir, ob es einen gebun-

denen Gradienten unter diesen Versuchsbedingungen überhaupt gibt.

Wir setzten drei Filter übereinander in eine Chemotaxis-Kammer ein, injizierten in das untere Kompartiment ^{125}Jod -Kasein, warteten fünf Minuten, um dem vorhandenen Kasein die Möglichkeit zu geben, sich an den Filter zu binden und pipettierten von oben 1 ml Medium auf.

Nach 90 minütigem Warten bauten wir die Filter aus, wuschen sie und prüften die Strahlung mit Hilfe eines Counters. Es ergaben sich von oben nach unten folgende counts per minute (cpm):

oberer Filter	365500 cpm
mittlerer Filter	522000 cpm
unterer Filter	613000 cpm

Man könnte sich vorstellen, daß die drei aufeinandergeschichteten Filter eine Einheit waren, die wir erst nachträglich zum Messen der Gammaaktivität aufgeschnitten hätten.

Die Differenz der Aktivitäten in den Filtern zeigte, daß sich in ihnen ein Gradient befand. Wie der Gradient in einem einzelnen Filter aussieht, können wir nicht sagen, da die Verhältnisse in drei Filtern in einer Kammer andere sind, als die, die sich einstellen, wenn sich nur ein Filter in einer Kammer befindet.

E 2. Leukozytenmigration bei filtergebundenen Gradienten

Nachdem der Gradient etabliert war, mußten wir prüfen,

ob dieser Gradient die Eindringtiefe der Zellen in die Filter beeinflusst.

Wir prüften also, ob sich im Laufverhalten der Zellen Unterschiede ergeben, je nachdem ob sie in einem positiven oder einem negativen Gradienten laufen.

Dazu behandelten wir zwei Kammerreihen so, als würde ein normaler Chemotaxisversuch durchgeführt. Auf den Filter pipettierten wir statt der Zellsuspension nur Medium. Wir ließen die Kammern 90 min stehen, so daß in den Filtern die gleiche Gradientensituation entstand, wie beim Chemotaxisversuch.

In beide Kammerserien setzten wir Kaseinmengen von 0,5 bis 4,5 mg pro ml Medium ein.

Nach 90 min nahmen wir die Filter aus den Kammern, wuschen sie mit der Filternutsche und setzten sie wieder ein. Dabei legten wir in die eine Serie die Filter genauso herein, wie wir sie herausgenommen hatten, während die Filter der anderen Kammern andersherum eingesetzt wurden. Durch diese Manipulation ergaben sich zwei entgegengesetzt gerichtete Gradienten.

Diese Versuchsreihe wurde mit einer kleinen methodischen Änderung durchgeführt. Wir legten die Filter nicht zwischen die Gummiringe (Abb. 1) sondern auf den Boden der Kammern. Dadurch erübrigte es sich, den unteren Kammeranteil füllen zu müssen. Das Migrationsverhalten der Zellen wurde hierdurch nicht beeinflusst.

Bei diesem Versuch ergaben sich nebenstehende Kurven (Abb. 11).

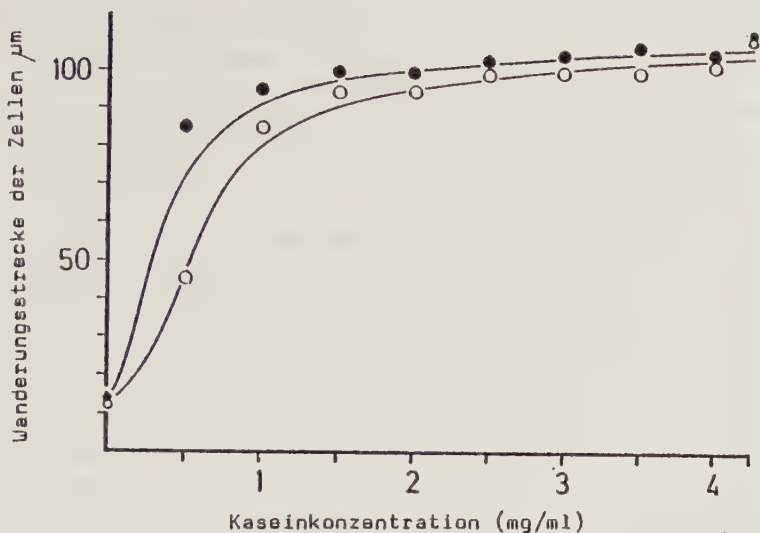


Abb. 11 - Vergleich zwischen positivem und negativem gebundenen Chemotaxansgradienten:

Bei diesem Versuch wurden zwei Kammerreihen mit Kasein in steigenden Konzentrationen im unteren Kompartiment gefüllt, und oben Medium aufpipettiert. Nach 90 min bei Raumtemperatur wurden die Filter gewaschen. Beim Wiedereinbau in die Kammern wurde eine Filterserie gleich herum wieder eingebaut (○ - ○), während die anderen Filter vor dem Einbau umgedreht wurden (● - ●), so daß sich in den beiden Filterserien entgegengesetzte Gradienten befanden.

Das Diagramm zeigt die Einwanderungstiefen der Zellen in Abhängigkeit von den Kaseinkonzentrationen, die zum Aufbau des Chemotaxansgradienten eingesetzt wurden.

Auffallend ist, daß die im negativen Gradienten gelaufenen Zellen bis 0.1 mg Kasein sich wesentlich weiter bewegt hatten, als die im positiven Gradienten.

Dies paßte gut zu den Erkenntnissen, die wir schon aus zwei vorhergehenden Versuchen gewonnen hatten. Sowohl bei den Versuchen ohne Gradienten (Abb. 5), als auch bei der Versuchsreihe, bei der das Kasein in die Zellsuspension gegeben wurde (Abb. 9), hatte sich ein eben solcher Anstieg gezeigt.

Daraus ist zu schließen, daß der negative Gradient die Zellen nicht hemmt, denn sonst müßte diese Kurve niedriger liegen, als die Kurve der Filter ohne Gradienten.

F. Schicksal des filtergebundenen Chemotaxans

Die amöboid migrierenden Zellen müssen in irgendeiner Form einen Kontakt zu der Oberfläche besitzen, auf der sie sich bewegen.

Dieser Kontakt könnte z.B. durch die auf der Oberfläche gebundenen Chemotaxansmoleküle dadurch gegeben sein, daß die Zellen sich daran binden. Ein derartiger Kontakt muß nicht nur durch Chemotaxansmoleküle vermittelt sein, sondern kann auch mit beliebigen anderen Oberflächenstrukturen eingegangen werden.

Damit die Zellen migrieren können, müssen sie in der Lage sein, die Bindung an die Unterlage wieder zu lösen. Im folgenden wollen wir uns nur mit den Interaktionen der oberflächengebundenen Chemotaxansmoleküle mit den auf ihnen migrierenden Zellen befassen.

Es ist mehrfach beschrieben, daß Zellen auf chemotaktische Reize hin genau wie bei der Phagozytose lysosomale Enzyme freisetzen. Dazu gehören z.B. Hydrolasen (15), oder auch die "aktivierbare" Serin-esterase (2). Es ist leicht vorstellbar, daß diese Enzyme die Bindungsstellen der Zellen zu spalten in der Lage sind. Gibt es diese Spaltung, so wird sie für die Chemotaxansmoleküle wohl nicht so aussehen, daß diese Enzyme genau an der Verbindungsstelle Chemotaxansmolekül - Zellrezeptor spalten werden. Vielmehr wird diese Spaltung irgendwo im Chemotaxansmolekül eintreten. Dies würde zur Folge haben, daß nach der Spaltung noch ein Teil des chemotaktisch wirksamen Moleküls am Rezeptor auf der Zellmembran hängenbliebe. Was geschieht mit diesem Rest?

Hierfür sind verschiedene Möglichkeiten vorstellbar. So könnten sich die an der Zelle gebundenen Molekülteile durch eine sterische Änderung ihrer selbst, oder des Rezeptors lösen (Abb. 12). Denkbar wäre es z.B. auch, daß diese Moleküle von der Zelle aufgenommen würden. Wäre dies der Fall, so müßte bei Chemotaxisversuchen mit ^{125}Jod -Kasein, nach dem Lauf einer Zelle durch einen derartig markierten Filter, ^{125}Jod in den Zellen nachweisbar sein. Wir führten derartige Versuche durch und testeten die eingewanderten Zellen auf ^{125}Jod . Wir schnitten die Filter in $5\text{ }\mu\text{m}$ dicke Scheibchen senkrecht zur Oberfläche. Diese Scheibchen autoradiographierten wir. Auf den sich ergebenden Negativen waren, bedingt durch das gebundene ^{125}Jod -Kasein, die Gitterstrukturen der

Filter im Mikroskop gut zu sehen. Darinliegende Flecken, die in Zellen aufgenommenes ^{125}Jod angezeigt hätten, fanden wir nicht.

Die beiden Filme waren allerdings so grobkörnig, daß ein klares Urteil nicht möglich war. Aus diesem Grunde versuchten wir, uns dem Problem von einer anderen Seite her zu nähern.

Wir beluden Filter mit fluoresceinmarkiertem IgG-antiIgG, welches im Filter aggregiert wurde (s.S. 18). Solches Gammaglobulin ist als Chemotaxans geeignet.

Nach Einwanderung der Zellen schnitten wir diese Filter in derselben Art, wie wir es vorher mit den ^{125}Jod -Kasein beladenen Filtern getan hatten (s.S. 17).

Die Betrachtung dieser Filterscheibchen unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab auch keine neuen Anhaltspunkte, da die am Filter gebundene Fluoreszenz alle möglicherweise aufgetretenen Änderungen überstrahlte.

Bei Vorversuchen hatten wir festgestellt, daß sich das Fluorescein durch Färbung nach Giemsa von Filtern und Zellen abwaschen läßt. Nicht wegwaschbar schien das in den Zellen befindliche Fluorescein zu sein.

Nach der Färbung nach Giemsa waren die Zellen im Lichtmikroskop gut zu sehen. Im Fluoreszenzstrahl zeigte sich kein in den Zellen liegendes Fluorescein.

Da wir keine Möglichkeit fanden, für die Situation im Filter wo die Zellen meist durchgeschnitten wurden, Positivkontrollen anzufertigen, war dieser Versuch nur bedingt stichhaltig. Die Frage, ob die Granulozyten Teil-

le des Chemotaxansmoleküls aufnehmen, ist demnach nicht
endgültig gelöst.

V. DISKUSSION

Chemotaxis ist bisher als ein Phänomen verstanden worden, das durch Moleküle vermittelt wird, die zur Zelle hindiffundieren, sich an ihre Membran binden und dort eine Art Schlüsselreiz ausüben, der die Zelle zur Bewegung veranlaßt (40).

Nach den hier vorgelegten Ergebnissen scheint diese Vorstellung korrekturbedürftig. Nicht die frei im Milieu sich befindlichen Chemotaxansmoleküle, sondern die auf einer Oberfläche gebundenen Moleküle haben sich als entscheidendes und wahrscheinlich auch bestimmendes Prinzip für die Migration von Granulozyten erwiesen. Nichtgebundene Chemotaxansmoleküle scheinen die Migration eher zu hemmen, als zu unterstützen.

Damit muß grundsätzlich unterschieden werden zwischen den Mechanismen, die sich bei einer begeißelten Zelle abspielen und denen, die bei einer amöboid beweglichen Zelle von Bedeutung sind. Dennoch wurden diese beiden Phänomene aber bislang unter dem gleichen Begriff subsumiert. Der Grund hierfür dürfte sein, daß die Vorgänge bei oberflächlicher Betrachtung die gleichen zu sein scheinen. Man setzt Zellen, ob begeißelt (im Falle von Bakterien) oder amöboid beweglich (im Falle von Leukozyten), einem chemotaktischen Stimulus aus und sieht eine Bewegung dieser Zellen aufgrund dieses Stimulus. Da inzwischen gezeigt werden konnte, daß begeißelte Zellen ihren Stimulus tatsächlich aus dem flüssigen Milieu heraus erhalten und durch Änderung der Geißel-

schlagrichtung auf den Reiz antworten (38, S. 10-13), wurde stillschweigend angenommen, daß sich dieses Konzept auch auf die amöboid beweglichen Zellen übertragen lasse. Wir konnten mit unseren Versuchen folgendes zeigen.

Den Kernpunkt unserer Überlegungen, daß auf der Oberfläche gebundenes Chemotaxans in der Lage ist, die Migration von Zellen zu verursachen, konnten wir durch mehrere Versuche belegen. Wir stellten fest, daß eine Migration von Zellen in der Standard-Testtechnik mit der Boydenkammer auch dann durch Kasein ausgelöst werden konnte, wenn ein Filter nur kurz einer Kaseinlösung ausgesetzt und dann sehr intensiv gespült wurde. Daß die Filter bei der Exposition von Kasein auch wirklich dieses zu binden vermochten, zeigten wir mit ¹²⁵Jod markiertem Kasein (Abb. 4). Je mehr Kasein angeboten wurde, desto mehr wurde auch an den Filter gebunden.

Kontrolliert haben wir diesen Versuch, indem wir die Kaseinmoleküle mit Hilfe von Papain wieder abdauten und feststellten, daß mit dem Abdauen des Chemotaxans auch die vorher durch Kasein verliehene chemotaktische Potenz wieder verloren ging (Abb. 7).

Mit diesem Ergebnis lassen sich die Untersuchungen von Keller und Sorkin (19) in Einklang bringen. Sie stellten fest, daß die physikochemischen Eigenschaften von Filtern das Migrationsverhalten von Leukozyten beeinflussen. Zu diesem Ergebnis kamen sie dadurch, daß sie zwei Filterchargen miteinander verglichen, die aus dem

gleichen Material von der gleichen Firma, aber mit Hilfe verschiedener Produktionsverfahren hergestellt worden waren. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Verhalten der Zellen in Filtern aus diesen beiden Chargen. Nach unserer jetzigen Kenntnis nehmen wir an, daß aufgrund einer unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit der Filter die Zahl der freistehenden reaktionsfähigen Gruppen die in der Lage sind Chemotaxansmoleküle zu binden, verschieden war. Bei weniger Bindungsstellen müßte demgemäß die Migration geringer ausfallen.

Aus unseren Versuchen läßt sich eine Aussage darüber machen, wodurch die Einwanderungstiefe der Zellen in die Filter begrenzt ist. Es hat sich gezeigt, daß es bei gleichbleibender Zeit eine größte Einwanderungstiefe der Zellen in die Filter gibt, die durch Zugabe von weiterem Chemotaxans nicht mehr vergrößerbar ist (Abb. 3, 5). Die Begrenzung der Einwanderungstiefe könnte verursacht sein einmal dadurch, daß Filter über ein bestimmtes Maß hinaus nicht mehr weiter mit Chemotaxans beladen werden können, zum anderen aber auch dadurch, daß unter den gegebenen Umständen die Grenze der Migrationsbereitschaft der Zellen erreicht ist.

Bei den Versuchen über die Beladbarkeit von Filtern mit ¹²⁵Jod markiertem Kasein zeigte sich, daß die Filter mit den von uns benutzten Kaseinkonzentrationen nicht vollständig zu sättigen waren (Abb. 4). Die Beladung der Filter stieg auch bei einem Kaseinangebot von mehr als 5 mg Kasein pro ml Medium noch stetig an, so daß sie

bei 40 mg Kasein pro ml Medium 0,3 mg betrug (s. S. 25). Da die Wanderungsstrecke der Zellen in diese Filter ab 3,5 mg Kasein pro ml Medium nicht mehr zunahm, folgt daraus, daß die maximale Eindringtiefe der Zellen in die Filter durch die Geschwindigkeit mit der die Zellen migrieren können, begrenzt ist.

Diese Geschwindigkeitsgrenze ist durch die mangelnde Fähigkeit der Zellen schneller zu migrieren verursacht; sie stellt demnach eine zellinhärente Begrenzung dar. Eine entsprechende Begrenzung gibt es auch bei geringen Chemotaxanskonzentrationen. Die Zellen benötigen eine gewisse Mindestmenge von oberflächengebundenen Chemotaxansmolekülen, bis der Migrationsprozeß beginnen kann.

Nur innerhalb dieser beiden Grenzen sind Gradientenprobleme betrachtbar, da man annehmen muß, daß die Zellen nur innerhalb dieser Grenzen in der Lage sind, auf eine Änderung der Chemotaxanskonzentration zu reagieren.

Um zu prüfen, ob Chemotaxis durch eine oberflächengebundenen Chemotaxansgradienten hervorruft ist, machten wir Experimente, bei denen wir versuchten, sowohl positive, als auch negative Gradienten in den Filtern aufzubauen. Wir ließen dem Chemotaxans in Anlehnung an die Inkubationszeit der Filter während der Chemotaxisversuche 90 min Zeit zum Aufbau des Gradienten. Es zeigten sich ab 1 mg Kasein nur noch sehr geringe Unterschiede zwischen Filtern mit positiven und Filtern mit negativen Gradienten (Abb. 11).

Bei diesen Versuchen lag aber der Verdacht nahe, daß 90 min Zeit zur Etablierung des Gradienten zu lange war, so daß kein hinreichender Konzentrationsunterschied mehr vorhanden war, um noch eine migrationsfördernde Wirkung zu haben. Diese Vermutung bestätigte sich durch gemeinsame Versuche mit Herrn Dr. Till aus dem Institut für Immunologie in Heidelberg. Durch Verkürzung der Zeit (auf 10 min), die dem Kasein gelassen wurde um einen Gradienten im Filter aufzubauen, entstand ein Unterschied in der Einwanderungstiefe. Die Zellen in Filtern, in denen sich ein positiver Gradient befand, wanderten etwa 20 μm weiter, als Zellen in Filtern mit gleichmäßiger Chemo-taxansbesetzung (nichtbeschriebene Resultate). Diese Versuche legen nahe, daß ein gebundener Chemotaxansgradient zumindest eine geringfügig längere Laufstrecke hervorzurufen vermag, als eine homogene Filterbeladung. Diese Differenz von 20 μm ist zu gering, um nun sicher sagen zu können, daß sie auf eine gerichtete Bewegung zurückzuführen ist.

In diesem Zusammenhang sind die Versuche von Carter (5) von besonderem Interesse. Er konnte zeigen, daß durch Änderung der physikochemischen Eigenschaften einer Oberfläche die Migrationsrichtung von Fibroblasten beeinflussbar war. Auf eine nicht befeuchtbare Celluloseacetatoberfläche wurde ein Gradient steigender Palladiumdichte aufgedampft. Dieser Palladiumgradient erzeugte einen Gradienten steigender Benetzbarkeit. Fibroblasten, die auf diesem Gradienten wanderten, bewegten sich in Richtung

auf die größere Benetzbarkeit hin. Carter erklärt dies damit, daß die Zelle eine gewisse Oberflächenspannung besitze und sich wie ein Wassertropfen verhielte. Auf einer gleichmäßig benetzbaren Oberfläche würde diese Zelle sich kreisrund ausbreiten. Carter zog daraus den Schluß, daß die Migration der Zellen in seinem System einen passiven Prozeß darstelle, der durch die Oberfläche, auf der sich die Zelle bewegt, weitgehend vorgegeben wurde. Damit hatte Carter gezeigt, daß die Oberflächenbeschaffenheit für die Migration von Bedeutung ist und die Richtung der Zellwanderung zu beeinflussen vermag.

Ähnlich wie Carter stellen auch wir uns vor, daß die Bestimmung der Richtung, in der sich die Zellen bewegen, teilweise ein passiver Prozeß ist: Es wird immer der Teil der Zelle die Richtung angeben, der vermittels seiner Bindungsstellen oder auch Rezeptoren die meisten bzw. festesten Kontakte mit den auf der Oberfläche sitzenden Chemotaxansmolekülen eingegangen ist.

Wenn dieser Vorgang auch passiver Natur zu sein scheint, so ist er doch eingebettet in ein höchst aktives Gesamtgeschehen. So ist gezeigt worden, daß Zellen im Verlauf ihrer Bewegung ohne Unterbrechung Zellanteile in die verschiedensten Richtungen wie Arme ausstrecken (38, S.5, Zit. nach Abercrombie, Heaysman and Pegrum 1970). Im Sinne unserer Erklärung würde einer dieser aktiv ausgestreckten Arme nun quasi passiv den festesten Halt finden und dadurch die Richtung der Wanderung bestimmen. Auf diese

Haftung hin würde dann wieder ein aktiver Vorgang folgen, im Verlauf dessen sich die Zelle von den ehemaligen Kontaktstellen lösen und auf die neue Stelle hinfließen würde.

Damit erhebt sich die Frage, ob eine Zelle ohne festen Oberflächenkontakt überhaupt zu wandern vermag, oder ob für jede Migration eine Art Chemotaxansrasen nötig ist. Die Tatsache, daß Zellen auch ohne gesonderte Zugabe von Chemotaxans ein wenig in die Filter einwandern, scheint diese Frage zu beantworten. Die Zellen besitzen demnach eine Grundbeweglichkeit, die als "random motility" bezeichnet wird (18, 20). Die "random motility" ist keine konstante Größe. Sie ist unter anderem von der Zellzahl abhängig, die auf die Filter aufgebracht wird. Eine größere Zellzahl ergibt eine größere "random motility".

Wie im experimentellen Teil dargestellt (s.S. 37), ist diese Grundbeweglichkeit ein Phänomen, welches mit den gleichen Mechanismen erklärbar ist, wie die normale Migration von Zellen. Auch hier dürften chemotaktisch wirksame Substanzen die entscheidende Rolle spielen. Diese Substanzen kommen aber nicht von außen in das System, sondern werden von den Zellen selbst gebildet, wie wir durch Förderung der Migration mit Zellsupernaten zeigen konnten (Abb. 8). Die Zellen legen sich also quasi ihren eigenen "Teppich".

Somit können wir die Verallgemeinerung treffen, daß jede Migration von amöboid beweglichen Zellen abhängig zu sein scheint von, mit chemotaktischen Substanzen besetzten Oberflächen.

Allein das auf einer Oberfläche gebundene Chemotaxans führt schon zur Migration von darauf befindlichen Leukozyten. Diese Migration ist ziellos; sie wird deshalb nach einer kürzlich getroffenen Übereinkunft der bekanntesten Chemotaxisforscher (20) als Chemokinese bezeichnet. Befindet sich auf einer Oberfläche ein Chemotaxansgradient, wo wird dieser Gradient die Zellen dahingehend beeinflussen, daß sie sich bevorzugt in Richtung auf die höhere Chemotaxanskonzentration hin bewegen werden (27). Nur der Zuwachs an Einwanderungstiefe der Zellen in die Filter über die Chemokinese hinaus, der auf die Beeinflussung der Migrationsrichtung zurückzuführen ist, wird in der oben zitierten Veröffentlichung (20) als Chemotaxis bezeichnet.

Setzt man nun Zellen auf Filter, in denen sich ein negativer Gradient befindet, das heißt, in denen sich die Zellen wenn sie migrieren, nur in Richtung auf die niedrigere Chemotaxanskonzentration hin bewegen können, so werden die Zellen trotzdem in die Filter eindringen (Abb. 11). Die Eindringtiefe der Zellen wird aber etwas geringer ausfallen, als bei einem positiven Gradienten, da die negative Gradientensituation dafür sorgen wird, daß die Zellen eine Tendenz haben werden, sich zur Filteroberseite zurückzubewegen. Trotzdem führt die Chemokinese zu einer beträchtlichen Eindringtiefe (Abb. 11). Man kann sagen, daß die Chemokinese die Zellen trotz negativem Gradienten in den Filter hineintreibt.

In der Chemotaxisliteratur ist auch der Begriff der ne-

gativen Chemotaxis eingeführt. Negative Chemotaxis heißt, daß die Zelle das Bestreben hat, sich von der höheren Konzentration eines entsprechend gearteten Chemotaxans weg zu bewegen (38, S. 4). Entsprechend unserer Auffassung erscheint eine negative Chemotaxis bei amöboid beweglichen Zellen nicht möglich. In der Literatur über die Migration von amöboid beweglichen Zellen, ist von einer negativen Chemotaxis auch nicht die Rede. Es handelt sich hierbei um ein Phänomen, welches nur bei begeißelten Zellen beobachtet wird (38, S. 10-13). Dies weist gleichzeitig darauf hin, daß sich hinter dem Begriff Chemotaxis völlig verschiedene Mechanismen verbergen, unterschieden jeweils nach dem Fortbewegungsmechanismus, dessen sich die Zellen bedienen.

Nachdem sich nun gezeigt hat, daß "random motility", Chemokinese und Chemotaxis durch gebundenes Chemotaxans hervorgerufen werden können, stellt sich die Frage, welchen Einfluß gelöstes Chemotaxans auf die migrierenden Zellen hat.

Unsere Versuche zeigen, daß gelöstes Kasein keinen Migrationsfördernden Einfluß auf Leukozyten ausübt. Dadurch sind auch die in der Einleitung erwähnten Theorien von Zigmond und Wilkinson (42, 40), die sich damit beschäftigten, wie die Zellen einen in der flüssigen Phase befindlichen Gradienten feststellen können, überflüssig geworden. Aus unseren Versuchen geht vielmehr hervor, daß gelöstes Chemotaxans die Migration von Zellen nicht nur nicht fördert, sondern eher hemmt (Abb. 10).

Diese Schlußfolgerung ist möglicherweise zu weitgehend, da es sich bei dem von uns benutzten Kasein um ein Substanzgemisch handelt, dessen Zusammensetzung wir nicht genau kennen. Daher könnte der Hemmeffekt eventuell von Komponenten in diesem Gemisch verursacht werden, die toxisch auf die Zellen wirken.

Hierfür spricht auch eine Untersuchung, die zeigte, daß mit Kasein, welches gegen PBS dialysiert worden ist, eine Hemmung der Migration von Granulozyten erst bei wesentlich höheren Kaseinkonzentrationen zu beobachten war (persönliche Mitteilungen von Dr. Till; inzwischen von uns bestätigt).

Anhand unserer Versuche und der Befunde der Literatur (5, 15, 40) läßt sich für die mechanischen Aspekte der Migration von amöboidbeweglichen Zellen ein Modell aufstellen (Abb. 12), das Vorstellungen enthält, die denen ähneln, die man sich heute über die Phagozytose macht (9). Dabei entspräche die Oberfläche, auf der sich die Zelle bewegt, dem zu phagozytierenden Partikel, den die Zelle aufgrund seiner Größe nicht umfassen kann. Mit dieser "opsonisierten" Oberfläche muß sich die Zelle auseinandersetzen. Ein Vorgang, der aus der Sicht der Phagozytose einer "frustranten" Phagozytose gleichkommt (13, 14). Wie bei der Phagozytose (9) müßte auch bei der Zellwanderung ein initialer Kontakt über geeignete Rezeptoren hergestellt werden. Bei diesen Bindungsstellen könnte es sich um Rezeptoren für spezifisch konfigurierte Gruppen, oder um Membranorte mit bestimmten Ladungseinheiten

oder hydrophoben Gruppen ohne Strukturspezifität handeln.

Es soll hier bewußt offengelassen werden, ob das jeweils benutzte Chemotaxansmolekül diesen Kontakt zwischen der Zelle und der Filteroberfläche herstellt, oder ob das Chemotaxansmolekül nur einen Induktor zellinterner Aktivierungsvorgänge darstellt. Im letzteren Falle würde die Kontaktaufnahme mit der Unterlage ohne Vermittlung des Chemotaxans erfolgen.

Wie wir uns die Migration von amöboid beweglichen Zellen vorstellen, ist in Abb. 12 schematisch dargestellt. Damit die Zelle sich weiterbewegen kann, muß sie über einen Mechanismus verfügen, der sie in die Lage versetzt, sich immer wieder von ihren Bindungen zu lösen. Henson (14) hat in einer Veröffentlichung über Probleme der Phagozytose gezeigt, daß neutrophile Leukozyten, die auf eine mit Immunkomplexen besetzte, nicht phagozytischen Oberfläche gesetzt werden verschiedenste Enzyme absondern, so auch Hydrolasen. Aufgrund unserer Papainversuche (Abb. 7) ist es ohne weiteres vorstellbar, daß diese Enzyme die Chemotaxansmoleküle, die die Zellen an die Oberfläche binden, spalten können. Dadurch käme die Zelle wieder frei, ihre Rezeptoren blieben jedoch möglicherweise besetzt. Die Möglichkeit, daß die Zelle Teile der Moleküle, die noch am Rezeptor hängen, eventuell aufnehmen, ist eher unwahrscheinlich. Henson kommt nämlich zu dem Ergebnis, daß die Zellen die IgG-Moleküle, durch die sie mit der Oberfläche verbunden sind, nicht phagozytieren (13).

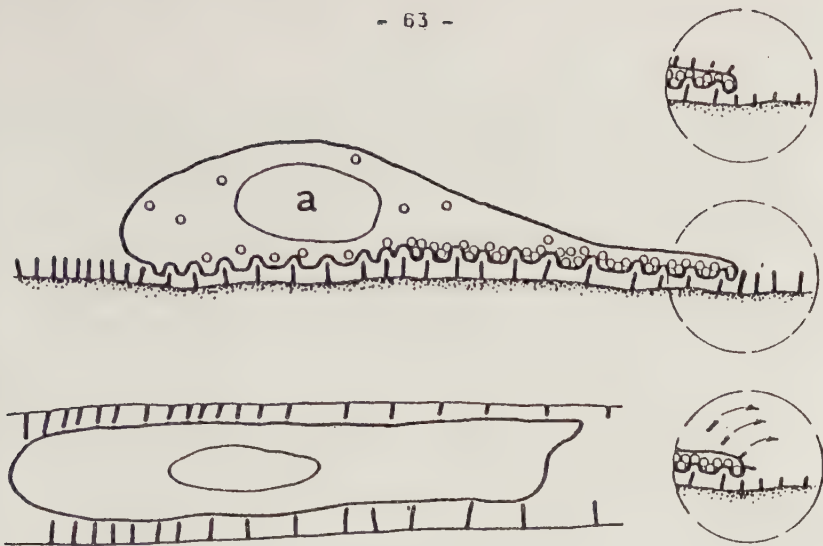


Abb. 12 - Schematische Darstellung einer migrierenden Zelle:

Wir stellen uns den Migrationsvorgang so vor, daß sich die Zelle auf einem Rasen von Chemotaxansmolekülen bewegt. Ob diese Chemotaxansmoleküle einen Teil der Bindungsstellen der Zelle mit der Oberfläche ausmachen, oder ob diese Bindung in irgendeiner Form unspezifisch erfolgt, wissen wir nicht.

Die Fortbewegung der Zelle auf dem Chemotaxansrasen geschieht unserer Ansicht nach dadurch, daß die Zelle von einer Bindungsstelle mit der Oberfläche zur nächsten hängt. Die bevorzugte Migrationsrichtung wird durch die Zellseite bestimmt, die die meisten Kontakte mit Chemotaxansmolekülen aufweist. Die Lösung der Zelle von der Oberfläche könnte durch proteolytische Spaltung der Bindungsstellen der Zelle durch lysosomale Enzyme geschehen.

Alternativ wäre es auch vorstellbar, daß sich nach Spaltung des Chemotaxansmoleküls bzw. eines anderen Moleküls, über welches die Zelle mit ihrer Unterlage verbunden ist, ein an der Zelle gebundener Rest durch eine sterische Änderung dieses Restes oder seiner Bindungsstelle an der Zelloberfläche sich von dieser löst und so abdiffundieren kann.

Analog zu den Vorstellungen von Harris (11) über den Fluß von Membranelementen könnten die noch mit Molekülfesten besetzten Bindungsorte auf der Zelloberfläche während der Migration an das Zellende gelangen und dort von der Zelle aufgenommen werden.

In der Zelle fände ein Transport zurück zum führenden Zellteil statt. Im Laufe dieses Transportes könnten diese Bindungsstellen wieder "gereinigt" werden. Dann würden sie wieder an der "Stirnseite" der Zellen in die Membran gelangen und der Prozeß begänne von neuem. Möglicherweise ließe sich eine dieser Vorstellungen mit markierten Chemotaxansmolekülen erhärten.

Das bisher diskutierte Modell von der Bewegung von Zellen ist anhand von *in vitro* Experimenten entwickelt worden. Wir müssen uns deshalb fragen, in wie weit man die Verhältnisse in vitro auf die Situation in vivo übertragen kann.

Auch ohne Entzündungsreiz verlassen Leukozyten die Gefäße und bewegen sich im Gewebe. Wir möchten annehmen, daß der Grund hierfür eine gewisse "Basischemotaxis" ist, die das

Gewebe besitzt. Es ist zu vermuten, daß die Oberflächen in einem Gewebe, die ja zu einem großen Teil durch die äußeren Membranen von Zellen dargestellt werden, verschiedenste Substanzen zu binden in der Lage sind. Es könnte sich dabei um Proteine aus dem Serum handeln, oder auch um Abfallprodukte der Zellen aus denen das Gewebe besteht.

Wie wir bei unseren Versuchen zur "random motility" gezeigt haben, können von Leukozyten ausgeschiedene Substanzen durchaus chemotaktisch wirksam sein, so daß der Schluß nahe liegt, daß dies auch für die Ausscheidungsprodukte anderer Zellen gilt. Ward (36) und Wilkinson (38, S.55-60) beschreiben eine Vielzahl von Zellausscheidungsprodukten, die in einem Gewebe vorkommen können und chemotaktisch wirksam sind.

Wir stellen uns vor, daß die Zellen über eine derartigen "Teppich" von, an das Gewebe gebundenen Substanzen dahinwandern.

Bei der Migration könnten diese Substanzen von den Leukozyten erfaßt und abgedaut werden. Dadurch könnte den Leukozyten auch eine Art "Gewebereinigungsfunktion" zukommen. Findet irgendwo im Gewebe durch eine Noxe eine besonders starke Freisetzung von chemotaktisch aktiven Substanzen statt, so wird sich der Leukozyt aufgrund seiner Fähigkeit zur Chemotaxis zum Ort dieser Noxe hinbewegen, um dort durch Phagozytose von Bakterien oder nekrotischen Partikeln nützlich zu sein.

Denkbar wäre jedoch auch, daß sich, im Gegensatz zum Kasein, im Gewebe freiwerdende Chemotaxansmoleküle an die Zellrezeptoren irreversibel binden könnten und so ihre Rezeptoren für eine weitere Migration blockieren würden. Dadurch würden die "zufällig vorbeikommenden" Zellen an Ort und Stelle liegen bleiben und auf diese Art und Weise angereichert werden, ohne daß eine gerichtete Bewegung von Zellen vorausgegangen sein müßte.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Bedeutung der Bindung von Chemotaxansmolekülen auf Zellulosenitratfiltern für darin migrierende Zellen zu ergründen.

Unsere Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Filter, an die Chemotaxantien gebunden sind, regen Granulozyten zur Wanderung an. Nichtgebundenes, in der flüssigen Phase befindliches Chemotaxans ist für die Migration von Granulozyten nicht notwendig.
2. Gelöste, nicht filtergebundene chemotaktisch wirksame Substanzen sind in der Lage, die Migration von Granulozyten zu hemmen.
3. Durch Abbauen von kaseinbesetzten Filtern durch Papain, läßt sich deren chemotaktische Potenz aufheben.
4. Auch für die als "Eigenbeweglichkeit" der Zellen erscheinende sogenannte random motility gilt, daß sie durch oberflächengebundene Substanzen vermittelt wird. Die Granulozyten scheiden selbst die Substanzen aus, die zur "random motility" führen.
5. Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir neue Vorstellungen über Mechanismen, die für die Migration von Zellen notwendig sind, entwickelt (vgl. Abb. 12) und in der Diskussion erörtert.

LITERATURVERZEICHNIS:

- 1 Andersen, B.R.; van Epps, D.E. 1972. Suppression of chemotactic activity of human neutrophils by streptolysin O. J. Inf. Dis. 125; No. 4: 353 - 359.
- 2 Becker, E.L. and Showell, H.J. 1974. The ability of chemotactic factors to induce lysosomal enzyme release II. The Mechanism of release. Journ. of Immunology 112: 2055 - 2062.
- 3 Boyden, S. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 115: 453 - 466.
- 5 Carter, S.B. 1967. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. Nature. 213: 256 - 261.
- 6 Carter, S.B. 1965. Principles of cell motility: The direction of cell movement and cancer invasion. Nature 208: 1183 - 1187.
- 7 Cornely, H.P. 1966. Reversal of chemotaxis in vitro and chemotactic activity of leucocyte fractions. Proc. Soc. Exp. Biol. und Med. 122: 831 - 835.
- 8 Gasko, O. and Danon, D. 1974. Endocytosis and Exocytosis in membrane remodelling during reticulocyte maturation. British Journ. of Haemat. 28: 463 - 470.
- 9 Griffin, F.M.; Griffin, J.A.; Leider, J.E. and Silverstein, S.C. 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. J. Exp. Med. 142: 1263 - 1282.
- 10 Harris, A.K. 1973. Behaviour of cultured cells on substrata of variable adhesiveness. Exp. Cell Res. 77: 285 - 297.

- 11 Harris, A.K. 1976. Recycling of dissolved plasma membrane components as an explanation of the capping phenomenon. *Nature* 263: 781 - 783.
- 12 Harris, H. 1953. Chemotaxis of Granulocytes. *J. Path. Bact.* 67: 135 - 146.
- 13 Henson, P.M. 1971. The immunologic release of constituents from neutrophil leucocytes. 1. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces on phagocytosable particles. *Journ. of Immun.* 107; No. 6: 1535 - 1546.
- 14 Henson, P.M. 1971. The immunologic release of constituents from neutrophil leucocytes. 2. Mechanisms of release during phagocytosis and adherence to nonphagocytosable surfaces. *Journ. of Immun.* 107; No. 6: 1547 - 1557.
- 15 Henson, P.M. 1971. Interaction of cells with immune complexes: Adherence, release of constituents, and tissue injury. *Journ. of Exp. Med.* 134: 114 - 135.
- 16 Henson, P.M. 1972. Complement-dependent adherence of cells to antigen and antibody. Mechanisms and consequences. *Biolog. Act. Complement*: 173 - 201.
- 17 Karnowsky, M.J.; Unanue, E.R. and Leventhal, M. 1972. Ligand induced movement of lymphocyte membrane makromolecules. *Journ. of Exp. Med.* 136: 907 - 930.
- 18 Keller, H.U.; Hess, M.W. and Cottier, H. 1975. Physiology of chemotaxis and random motility. *Sem. in Hematol.* 12: 47 - 57.
- 19 Keller, H.U. and Sorkin, E. 1967. Studies on chemotaxis IX. Migration of rabbit leucozytes through filter membranes. *Proc. Soc. Biol. Med.* 126: 677.
- 20 Keller, H.U.; Wilkinson, P.C.; Abercrombie, M.; Becker, E.L.; Hirsch, J.G.; Miller, M.E.; Ramsey, W.S.; Zigmond, S.H. 1977. A proposal for the definition of terms related to locomotion of leucocytes and other cells. *Clin. exp. Immunol.* 27: 377-388.

- 21 Lewis, W.H. 1931. Locomotion of lymphocytes.
Bullet. of the Johns Hopkins Hospital 49: 29 - 36.
- 22 MacConahey, P.J.; Dixon, F.J. 1966. A Method of
Trace Iodination of Proteins for Immunologic Studies. Int. Arch. Allergy 29: 185 - 189.
- 23 Mc Farland, W.; Heilman, D.H. and Moorhead, J.F. 1966.
Functional anatomy of the lymphocyte in immunological reactions in vitro. Journ. of Exp. Immun. 124: 851 - 857.
- 24 Moon, V.H. and Tereshakovec, G.A. 1951. Dynamics of
inflammation and of repair. II. Chemotactic substances in normal tissues. Arch. of Path.: 441 - 446.
- 25 Nelson, R.D.; Quie, P.G. and Simmons, R.L. 1975.
Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphnuclear leucocytes and monocytes. Journ. of Immun. 115; No. 6: 1650 - 1656.
- 26 Prescott, K.M. and David, G.S. 1974. The use of
polaroid land film in radioautography.
Analytical Biochemistry 57; No. 1: 232 - 239.
- 27 Ramsey, W.S. 1972. Analysis of individual leucocyte
behaviour during chemotaxis. Exp. Cell Research 70: 129 - 139.
- 28 Rich, A.R.; Wintrobe, M. and Lewis, M.R. 1939.
The differentiation of myeloblasts from lymphoblasts by their manner of locomotion. Bullet. Johns Hopkins Hosp. 65: 291 - 308.
- 29 Ryan, G.B.; Borysenko, J.Z.; Kanovsky, M.J. 1974.
Factors affecting the redistribution of surface-bound concanavalin A on human polymorphnuclear leucocytes. Journ. Cell. Bio. 62: 351 - 365.
- 30 Schreiner, G.F. and Unanue, E.R. 1975. Anti-Ig triggered movements of lymphocytes - specificity and lack of evidence for directional migration.
Journ. of Immun. 114: 809 - 814.

- 31 Smith, C.W. and Hollers, J.C. 1970. The pattern of binding of fluorescein-labelled concanavalin A to the motile lymphocyte. Journ. Rethiculoendoth. Soc. 8: 458 - 464.
- 32 Tack, J.L.; Beucher, F.; Maillard, J. and Voisin, G.A. 1974. Triple pathway for induction of chemotaxis in neutrophil leucocytes by guinea-pig immune complexes of different Ig-classes. Int. Arch. Allergy 47: 609 - 622.
- 33 Unanue, E.R.; Perkins, W.D. and Karnovsky, M.J. 1972. Ligand induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. I. Analysis by immunofluorescence and ultrastructural radioautography. Journ. Exp. Med. 136: 885 - 906.
- 34 Unanue, E.R.; Karnovsky, M.J. and Engers, H.D. 1974. Ligand induced movement of lymphocyte membrane makromolecules. III. Relationship between the formation and fate of anti-Ig surface Ig complexes and cell metabolism. Journ. Exp. Med. 137: 675 - 689.
- 35 Unanue, E.R.; Ault, K.A. and Karnovsky, M.J. 1974. Ligand induced movement of lymphocyte surface makromolecules. IV. Stimulation of cell motility by anti-Ig and lack of relationship to capping. Journ. Exp. Med. 139: 295 - 312.
- 36 Ward, P.A. 1974. Leucotaxis and leucotactic disorders. American Journal of Pathol. 77; No. 3: 520 - 538.
- 37 Ward, P.A. and Becker, E.L. 1967. The deactivation of rabbit neutrophils by chemotactic factor and the nature of the activatable esterase. Journ. Exp. Med. 127: 693 - 709.
- 38 Wilkinson, P.C.; 1974. Chemotaxis and inflammation. Churchill Livingstone, London.
- 39 Wilkinson, P.C. 1975. Chemotaxis of leucocytes. Copy from: Primitive sensory and communication system. Ed. Carlile, M.J. Academic Press N.Y. 1975; Chap. 6: 207 - 243.

- 40 Wilkinson, P.C. 1976. Recognition and response in mononuclear and granulat phagocytes. Clin. exp. Immun. 25: 355 - 366.
- 41 Zigmond, S.H. and Hirsch, J.G. 1973. Leucocyte locomotion and chemotaxis. Journ. Exp. Med. 137: 387 - 410.
- 42 Zigmond, S.H. 1974. Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphnuclear leucocytes. Nature 249: 450 - 452.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. M.P. Dierich für die Überlassung der Fragestellung und die besondere Förderung, die er mir und der Arbeit zukommen ließ.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. Till, der mich in die Methode der Chemotaxis und die Denkweise, die ihr zugrunde liegt, einwies.

Lebenslauf

Am 27. April 1953 wurde ich als dritter von fünf Söhnen des Hautarztes Dr. med. Wilhelm Georg Wilhelmi und seiner Frau Heiga Maria, geb. Reis in Trier geboren.

1959 - 1963	Volksschule St. Laurentius in Trier
1963 - 1972	Besuch des mathematisch naturwissenschaftlichen Zweiges des Max-Planck-Gymnasiums in Trier
Mai 1972	Abitur am Max-Planck-Gymnasium
1972 - 1973	Wehrpflichtiger bei der Bundeswehr
April 1973	Beginn des Studiums der Medizin an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz
März 1975	Ärztliche Vorprüfung
März 1976	Erster Teil des Staatsexamens
März 1978	Zweiter Teil des Staatsexamens
Mai 1979	Dritter Teil des Staatsexamens
Mai 1979	Approbation als Arzt
Juli 1979	Promotion an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz

Druck: Reinartz

Copier- und Offset-Center

Gaustraße 16, Telefon 061 31/93870 + Kirschgarten 3, Telefon 061 31/96202
6500 Mainz

